

**ALLOSTERISCHE INHIBIERUNG UND AKTIVIERUNG DER PROTEINTYROSINPHOSPHATASE
SHP-1 DURCH MONO- UND BIVALENTE SH2-PHOSPHOPEPTIDLIGANDEN**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Kathleen Teichmann
geboren am 01.06.1978 in Altenburg

- | | |
|--------------|---|
| 1. Gutachter | PD Dr. Diana Imhof, Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| 2. Gutachter | Prof. Dr. Gerhard Scriba, Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| 3. Gutachter | Prof. Dr. Torsten Steinmetzer, Philipps-Universität Marburg |

Tag der öffentlichen Verteidigung 12.10.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	PROTEINKINASEN UND PROTEINPHOSPHATASEN	2
2.1	Reversible Phosphorylierung	2
2.2	Klassifizierung der Phosphatasen	3
2.3	Katalysemechanismus der Proteintyrosinphosphatasen	5
2.4	SH2-Domänen-enthaltende Proteintyrosinphosphatasen	6
2.4.1	Die Proteintyrosinphosphatase SHP-1	7
2.4.1.1	Expressionsmuster	7
2.4.1.2	Struktur	8
2.4.1.3	Regulationsmechanismen	10
2.4.1.4	Substratspezifität	14
2.4.1.5	Biologische Funktionen	16
2.5	Die SH2-Proteindomänen	22
2.5.1	Struktur von SH2-Domänen	22
2.5.2	Bindungspartner der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2	24
2.5.3	Effektoren der SH2-Interaktionen von SHP-1	28
3	ZIELSTELLUNG	32
4	MATERIALIEN UND METHODEN	34
4.1	Materialien	34
4.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	34
4.1.2	Puffer	36
4.1.3	Bakterienstämme	38
4.1.4	Plasmide	38
4.2.	Methoden	38
4.2.1	Festphasenpeptidsynthese	38
4.2.1.1	Darstellung der linearen Peptide	38

4.2.1.2	Darstellung der zyklischen Peptide	39
4.2.1.3	Darstellung des Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Peptides	40
4.2.2	Aufreinigung und Charakterisierung der Peptide	42
4.2.2.1	Semipräparative HPLC	42
4.2.2.2	Analytische HPLC	43
4.2.2.3	Massenspektrometrie	44
4.2.2.4	Dünnschichtchromatographie	44
4.2.2.5	Aminosäureanalyse	44
4.2.3	Expression und Aufreinigung der GST-N-SH2-Domäne in <i>E. coli</i>	44
4.2.3.1	Bakterienlyse	45
4.2.3.2	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration	45
4.2.4	Expression und Aufreinigung von <i>full length</i> SHP-1 in <i>E. coli</i>	45
4.2.4.1	Expression des GST-SHP-1-Fusionsproteins	46
4.2.4.2	Aufreinigung des GST-SHP-1-Fusionsproteins	46
4.2.4.3	Spaltung des GST-Tags	47
4.2.5	Analyse der GST-Fusionsproteine mittel SDS-Page nach Lämmli	47
4.2.6	Konzentrationsbestimmungen	48
4.2.6.1	Malachitgrünassay	48
4.2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	48
4.2.7	Biologische Testung	48
4.2.7.1	Phosphatase-Aktivitätstest	48
4.2.7.2	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	49
4.2.8	Dockingstudien	49
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	51
5.1	Auswahl der Phosphopeptidliganden	51
5.2	Darstellung der Phosphopeptidliganden	56
5.3	Charakterisierung der Phosphopeptidliganden	60
5.4	Biologische Testung	61
5.4.1	Modulation der Phosphataseaktivität von SHP-1	61
5.4.2	Bestimmung der Bindungsaffinität für die N-SH2-Domäne	65

5.4.3	Dockingstudien zur Assoziation der Phosphopeptidliganden an die SHP-1 N-SH2- Domäne	68
5.5	Darstellung des Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Peptides	71
6	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	79
ANHANG		85
	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	104
	Ehrenwörtliche Erklärung	105
	Lebenslauf	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen für Aminosäuren und -derivate wurden entsprechend den Empfehlungen des Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB) und der IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) vorgenommen [1, 2]. Die Aminosäuren und -derivate besitzen, wenn nicht anders gekennzeichnet, L-Konfiguration.

Abb.	Abbildung
Abu(β Ph)	α -Amino- β -phenylbuttersäure
Ado	8-Amino-3,6-dioxaoktansäure
All	Allyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCR	B cell receptor
Blk	B-lymphocyte kinase
BLNK	B-cell linker protein
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
Btn	Biotin
Bzl	Benzyl
CD	cluster of differentiation
CDC25	cell division cycle 25 protein
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
c-Kit	Csk homologous kinase
CSF	colony stimulating factor
DCM	Dichlormethan
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	desoxyribonucleic acid
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration, die Aktivierung auslöst
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
Erk	extracellular regulated kinase
FcγRIIB1	IgG Fc receptors RIIB1
(Et) ₂ NP[O ^t Bu] ₂	Di- <i>tert</i> -butyl-N,N-diethylphosphoramidit
Fmoc	9-Flourenylmethyloxycarbonyl
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor
GM-CSFR	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor-Rezeptor
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylguanidiniumhexafluorophosphat
Hfe	Homophenylalanin
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high pressure liquid chromatography
Ig	Immunglobulin
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat-1
IL	Interleukin
IFNγ	Interferon γ
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITAM	immunoreceptor tyrosine based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine based inhibition motif
Jak	Januskinase
Jnk	c-jun N-terminal kinase
kb	Kilobase, 1000 Basenpaare
k _{cat}	Wechselzahl
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitorkonstante
KIR	killer cell inhibitory receptor
K _M	Michaelis-Konstante
LAR	leucocyte antigen related phosphatase
Lck	Lymphocyten-spezifische Tyrosin Kinase
LIR	leucocyte immunoglobulin-like receptor

LMPTP	low molecular weight Proteintyrosinphosphatase
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP	MAPK-Phosphatase
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
mCPBA	m-Chlorperoxybenzoesäure
M-CSFR	Makrophagen koloniestimulierender Faktor-Rezeptor
me	motheaten
me ^v	viable motheaten
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
M _w	Molekulargewicht
NFκB	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
Nle	Norleucin
NLS	Nukleäre Lokalisations-Sequenz
OD	optische Dichte
p120 ^{ctn}	Zell-Adhäsionsprotein p120 Catenin
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PIR-B	paired-Ig-like receptor B
PLC _γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PPM	magnesiumabhängige Proteinphosphatase
PPP	Phosphoproteinphosphatase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
R _f	Retentionsfaktor
RNA	ribonucleic acid
Ros	Onkogen des "aviral sarcoma virus UR2"
RTK	Rezeptortyrosinkinase

RU	resonance unit
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser(β Ph)	β -Phenylserin
SH2	Src-Homologie Domäne 2
SHIP	Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase
SHP	Src-Homologie Phosphatase
SIRP α	signal-regulatory protein α
SPR	surface plasmon resonance
Src	von "Sarkom auslösend"
Tab.	Tabelle
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylguanidiniumtetrafluoroborat
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TCF	T cell factor
TCR	T cell receptor
TIPS	Triisopropylsilan
TEA	Triethanolamin
TEMED	1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
t_R	Retentionszeit
Tyk 2	Tyrosinkinase 2
ZAP-70	zeta-chain-associated protein kinase 70

1. EINLEITUNG

Um Signale zu erzeugen und weiterzuleiten bedienen sich nahezu alle intrazellulären Signalwege der Phosphorylierung von Proteinen. Die antagonistischen Wirkungen von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen sind hierbei entscheidend für die Aufrechterhaltung des Phosphorylierungslevels von Signalproteinen. Das ubiquitäre Vorkommen von Phosphoproteinen unterstreicht deren Schlüsselrolle bei einer Reihe zellulärer Prozesse, wie z.B. Zellwachstum, Differenzierung, Zellmigration und Immunantwort. Die Weiterleitung von Signalen beruht auf Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen der Phosphorylierungsstelle und nachgeschalteten Effektorproteinen, die z.B. Phosphotyrosinspezifische Proteindomänen (z.B. PTB- und SH2-Domänen) besitzen.

Die zytosolische Proteintyrosinphosphatase SHP-1 enthält neben der katalytischen PTP-Domäne zwei SH2-Domänen (N- und C-SH2). SHP-1 wird sowohl in hämatopoetischen als auch in epithelialen Zellen exprimiert und fungiert in diesen Zellen vorwiegend als negativer Regulator zellulärer Signalwege. Die strukturelle Charakterisierung des Enzyms zeigt, dass die N-SH2-Domäne an der allosterischen Aktivierung der katalytischen Aktivität von SHP-1 beteiligt ist. Dabei blockiert die N-SH2-Domäne das katalytische Zentrum des Enzyms und besitzt damit einen autoinhibitorischen Charakter. Die Bindung eines Phosphotyrosin-haltigen Liganden an die N-SH2-Domäne führt zur Konformationsänderung innerhalb der PTP/N-SH2-Kontaktregion und folglich zur Dissoziation der beiden Domänen. Um diesen Mechanismus detaillierter beschreiben zu können, ist es notwendig, SHP-1 im Komplex mit einem hochaffinen Inhibitor zu kristallisieren. Solche Inhibitoren sind außerdem nützliche Werkzeuge zur Untersuchung von Signalwegen an denen SHP-1 beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollen aufbauend auf den in der Literatur beschriebenen Serien konformationsstabilisierter N-SH2-Liganden neue Liganden abgeleitet werden, mit dem Ziel über verschiedene Arten der Assoziation die enzymatische Aktivität von SHP-1 zu modulieren. Mit Hilfe der sich daraus ableitenden monovalenten und bivalenten Phosphopeptide soll der Dissoziationsprozess der N-SH2-Domäne von der PTP-Domäne verhindert werden.

2. PROTEINKINASEN UND PROTEINPHOSPHATASEN

2.1 REVERSIBLE PHOSPHORYLIERUNG

Die reversible Phosphorylierung ist einer der wichtigsten und häufigsten posttranslationalen Mechanismen zur Übertragung von Signalen und der Regulation von biologischen Prozessen in der Zelle. Zelluläre Vorgänge, wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Metabolismus, Zellzyklus, Gentranskription, Zell-Zell-Interaktionen, Immunantwort und Apoptose werden durch das Zusammenspiel von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen reguliert [3-5]. Die Übertragung von γ -ständigen Phosphatgruppen energiereicher Moleküle (ATP bzw. GTP) auf bestimmte Aminosäuren (Serin, Threonin, Tyrosin) des Zielproteins, wird durch die Proteinkinasen realisiert. Einen weiteren Kontrollpunkt der reversiblen Phosphorylierung stellen die Proteinphosphatasen dar. Diese sind in der Lage das kovalent gebundene Phosphat durch Hydrolyse wieder abzuspalten. Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung kann zu einer strukturellen und damit verbundenen funktionellen Änderung des Proteins führen (Abb. 1).

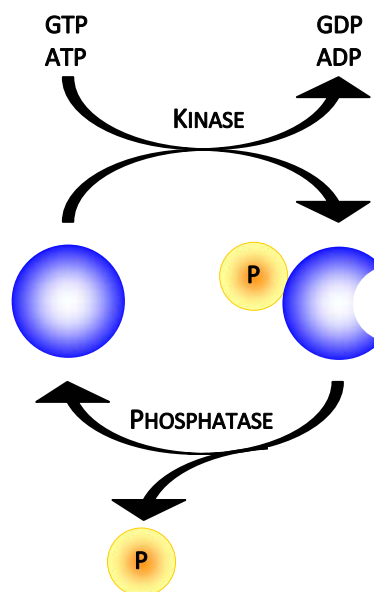


Abb. 1 Reversible Phosphorylierung von Proteinen, nach [6].

Störungen des Gleichgewichtes zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung in den Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von beispielsweise Krebs- und Immunschwächeerkrankungen. Etwa 30% aller intrazellulären Proteine sind Ziel für

eine Phosphorylierung [7]. Dabei ist das Phosphorylierungslevel von Tyrosin (0,01 – 0,05%) gemessen an der Gesamtphosphorylierung der zellulären Proteine relativ gering gegenüber der Phosphorylierung von Serin (~ 90%) und Threonin (~ 10%) [8, 9].

2.2 KLASIFIZIERUNG DER PHOSPHATASEN

Die Proteinphosphatasen können in zwei Enzymfamilien, die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen und die Proteintyrosinphosphatasen unterteilt werden. Serin/Threonin-Proteinphosphatasen gliedern sich in die Gruppe der Phosphoproteinphosphatasen (PPP) und der magnesiumabhängigen Proteinphosphatasen (PPM). Zur PPP-Gruppe zählen die Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1, PP2A) sowie die Calcium-Calmodulin regulierte Proteinphosphatase 2B (PP2B). Weiterhin ergänzt wird die Gruppe der Säuger-Proteinphosphatasen durch PP4, PP5, PP6 und PP7 [10, 11]. Die Aktivität der Proteinphosphatase 2C (PP2C) sowie der Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase ist von Magnesiumionen abhängig, weshalb man diese Phosphatasen zur PPM-Gruppe zählt.

Mit der Isolierung und Strukturaufklärung der ersten Proteintyrosinphosphatase-1B (PTP-1B) aus der humanen Plazenta vor ca. 20 Jahren konnte eine zweite, große Familie von Enzymen klassifiziert werden [12, 13]. Mittlerweile wurden über 100 Gene im menschlichen Genom der PTP-Familie zugeordnet, die sich in 2 Hauptgruppen einteilen lassen (Abb. 2). Die Mitglieder der Cystein-basierenden PTPs zeichnen sich durch ein zentrales Signaturmotiv [I/V]HCxAGxxR[S/T]G innerhalb ihrer PTP-Domäne aus, welches ein hoch konserviertes Cystein enthält (siehe Kapitel 2.3) [14, 15]. Im Gegensatz dazu enthält die katalytische Domäne der Asp-basierenden EYA-Proteine Erkennungsmotive der HAD (haloacid dehalogenase)-Hydrolasen und nutzt in einer Kationen-abhängigen Reaktion einen invarianten Aspartatrest zur Hydrolyse des Phosphatrestes [16, 17]. Die Mitglieder der Klasse 1 Cys-basierenden Proteintyrosinphosphatasen können aufgrund ihrer PTP-Domänenarchitektur und Substratspezifität in klassische und in dualspezifische PTPs eingeteilt werden. Die Tyrosin-spezifischen, klassischen Phosphatasen können dabei in transmembrane (RPTP) und zytosolische (NRPTP) Proteintyrosinphosphatasen differenziert werden [18]. Die Anzahl der im Genom verschlüsselten PTP-Domänen ist hierbei hö-

her als die Anzahl der PTP-Gene. Grund hierfür ist das Auftreten von Tandem-Domänen bei den zytosolischen Proteintyrosinphosphatasen (Abb. 2) [14].

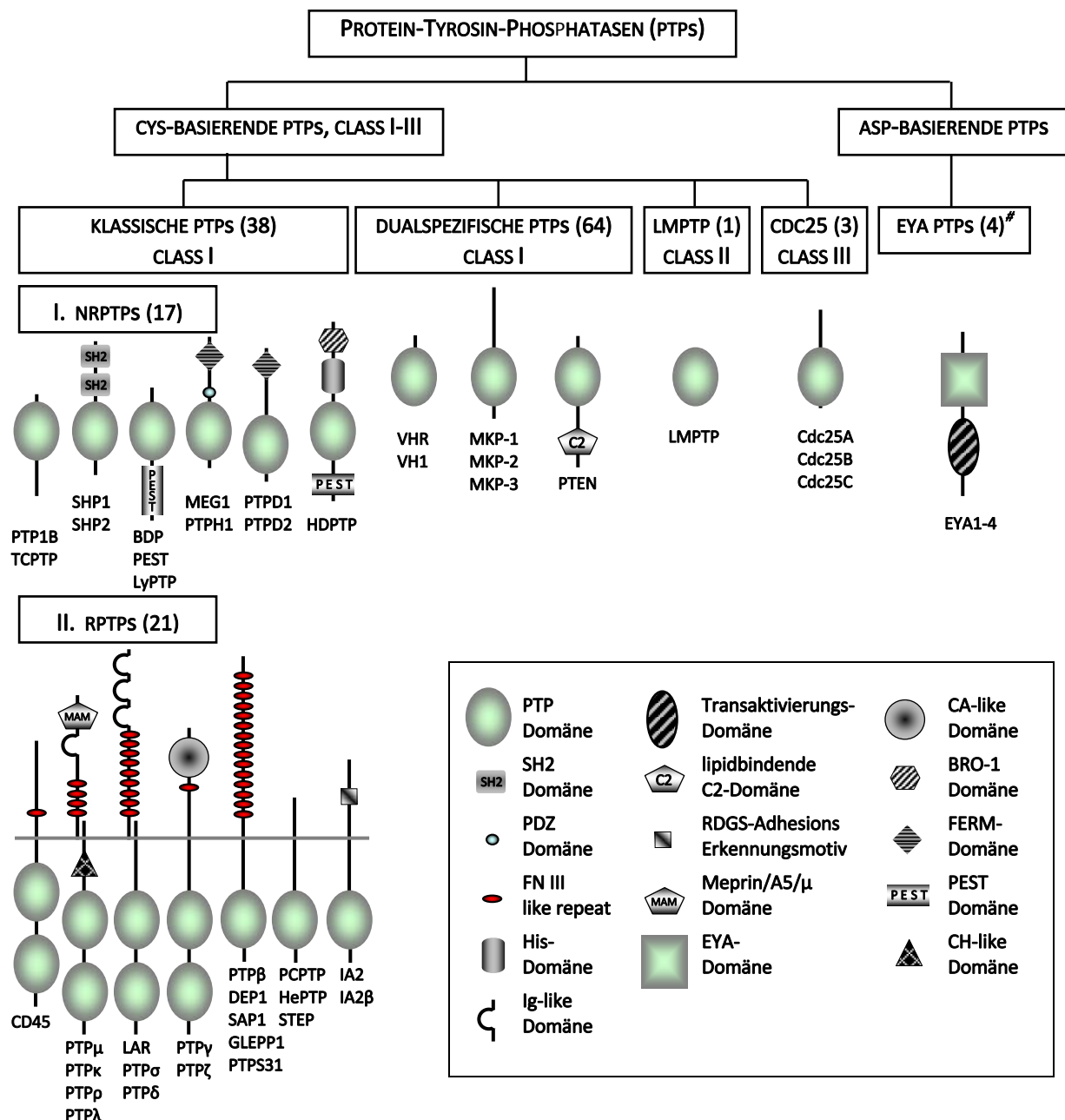


Abb. 2 Klassifizierung der PTP-Familie modifiziert nach [14, 18, 19].

[#]momentan keine eindeutige Zuordnung aufgrund bestehender Widersprüche zwischen Katalysemechanismus und Substratspezifität [17, 20]

Dualspezifische PTPs sind in der Lage sowohl Phosphotyrosin als auch Phosphoserin und Phosphothreonin zu dephosphorylieren. MAP Kinase Phosphatasen (MKPs) sind Vertreter dieser Klasse, zu deren Substraten die MAP-Kinasen Erk, Jnk und p38 gezählt werden [21].

Die Familie der „Low molecular weight“-Proteintyrosinphosphatasen (LMPTP) wird im Genom durch ein einzelnes Gen (*ACP1*) präsentiert, welches ein 18-kDa Enzym codiert [14]. LMPTP sind in die Regulation des Zellwachstums involviert. Sie assoziieren und dephosphorylieren Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie z.B. den PDGF-Rezeptor, den Insulin-Rezeptor und den Ephrin-Rezeptor [22].

Die 3. Klasse der Cys-basierenden PTPs umfasst die drei Mitglieder Cdc25A, Cdc25B und Cdc25C, die durch Dephosphorylierung und folgender Aktivierung von CDKs (Cyclin-abhängigen Kinasen) den Zellzyklus regulieren [23].

2.3 KATALYSEMECHANISMUS DER PROTEINTYROSINPHOSPHATASEN

Sequenzuntersuchungen von Proteintyrosinphosphatasen suggerierten, dass diese ein konserviertes Strukturelement mit ~ 250 Aminosäuren aufweisen. Charakteristisch für die PTP-Domänen ist das zentrale Signaturmotiv [I/V]HCxAGxxR[S/T]G, welches am Boden der Substratbindungstasche lokalisiert ist und das katalytische Zentrum bildet [24].

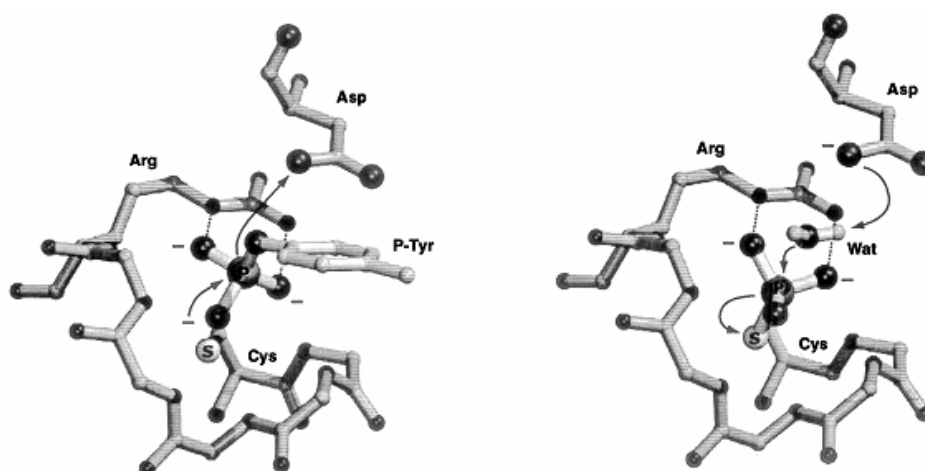


Abb. 3 Katalysemechanismus der Proteintyrosinphosphatasen [25].

Die Bindungstasche wird aus einer Vielzahl von α -Helices und β -Faltblättern und der sogenannten WPD-Schleife [WPDxGXP] mit dem katalytisch wichtigen Aspartatrest gebildet [18, 25]. Die Tiefe der Substratbindungstasche entscheidet dabei über die Spezifität der PTP-Domäne. Die mit 9 Å tiefere Bindungstasche der Proteintyrosinphosphatasen dephosphorylieren ausschließlich Tyrosin-phosphorylierte Substrate. Dagegen sind die fla-

chenen Bindungstaschen (6 Å) der dualspezifischen Phosphatasen in der Lage, sowohl pTyr-, als auch pSer/pThr-haltige Substrate umzusetzen [26, 27].

Die Bindung des Substrates führt zu einem nukleophilen Angriff des als Thiolat vorliegenden Cysteinrestes auf das Phosphatatom des modifizierten Tyrosins (Abb. 3). Dies resultiert in der Ausbildung eines Thiophosphoryl-Intermediates, welches durch die Guanidiniumgruppe des im katalytischen Zentrum verankerten Argininrestes stabilisiert wird. Hervorgerufen durch die Substratbindung erfährt die WPD-Schleife einen Konformationswechsel, wobei der Aspartatrest im Bereich des katalytischen Zentrums positioniert wird. Die säurekatalytische Protonierung des phenolischen Sauerstoffatoms der Tyrosinabgangsgruppe durch den Aspartatrest erleichtert dabei den Austritt des Tyrosins. Anschließend wird durch den nukleophilen Angriff eines durch den Aspartatrest polarisierten Wassermoleküls aus dem intermediär gebildeten Thiophosphoryl-Komplex Phosphat freigesetzt [9, 25].

2.4 SH2-DOMÄNEN-ENTHALTENDE PROTEINTYROSINPHOSPHATASEN

Eine Subfamilie der zytosolischen Proteintyrosinphosphatasen bilden die SH2-Domänen-enthaltenden Phosphatasen SHP-1[#] und SHP-2[#]. Trotz struktureller Gemeinsamkeiten (ca. 60% Sequenzhomologie) zeigen beide Proteine Unterschiede in ihren Expressionmustern und biologischen Funktionen. Während SHP-2 ubiquitär auftritt, beschränkt sich die Expression von SHP-1 auf epitheliale und vor allem hämatopoetische Zellen. Hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz ist SHP-1 primär in die negative Regulation von Signalwegen involviert, während SHP-2 eine positive Regulatorfunktion ausübt. Beide Proteine besitzen N-terminal zwei SH2 (Src Homologie 2)-Domänen, die über eine kurze Sequenz, die sogenannte „*hinge*“-Region, mit der katalytisch aktiven PTP-Domäne verbunden sind (Abb. 4).

[#]In der Literatur wurden alternativ die folgenden Bezeichnungen für SHP-1 und SHP-2 verwendet: (I) HCP, PTP1C, PTPN6, SH-PTP1, SHP und (II) Syp, PTP1D, PTPN11, SHPTP2, PTP2C, SHPTP-3.

Der sich an die PTP-Domäne anschließende C-terminale Teil (*C-tail*) besitzt zwei konservierte Tyrosinreste, die an der Regulation der Phosphataseaktivität beteiligt sind (siehe Kapitel 2.4.1.3).

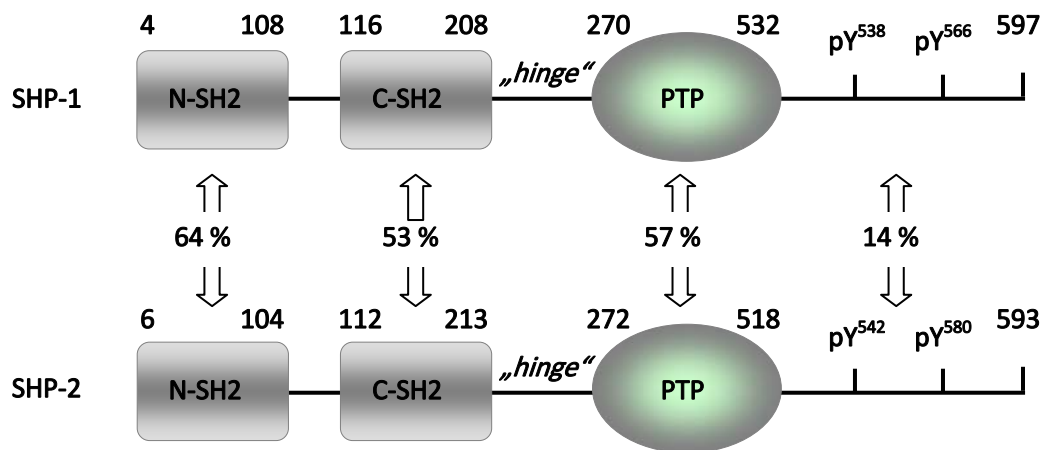


Abb. 4 Domänenstruktur von SHP-1 und SHP-2 (% = Sequenzhomologie) [28, 29, 30].

2.4.1 DIE PROTEINTYROSINPHOSPHATASE SHP-1

2.4.1.1 EXPRESSIONSMUSTER

PLUTZKY *et al.* konnten im menschlichen Genom auf Chromosom 12 (12p13.31) das Gen *PTPN6* entschlüsseln, welches die Proteintyrosinphosphatase SHP-1 exprimiert. Auf dem Chromosom konnten 17 Exons identifiziert werden [31, 32, 33]. Das sogenannte (I)SHP-1 Transkript wurde erstmals aus humanen Brustkrebszellen isoliert [34]. Vorwiegend in hämatopoetischen Zellen konnte eine weitere Transkriptform ((II)SHP-1) aufgezeigt werden [35]. Die cDNA Sequenzen von (I)SHP-1 und (II)SHP-1 sind mit Ausnahme der 5' untranslatierten Region und der initialen codierten Nukleotide identisch [36]. Die Expression von humaner SHP-1 wird durch zwei Promotor geregelt. Dabei unterscheidet sich die Nutzung der Promotor in hämatopoetischen Zellen von der in epithelialen Zellen. In epithelialen Zellen ist der Translationsstart in Exon 1 lokalisiert, welches die Initialsequenz MLSRG ((I)SHP-1, 597 Aminosäuren) codiert. Der 7 kb *downstream* gelegene Promotor 2 (Exon 2) generiert sowohl in epithelialen als auch in hämatopoetischen Zellen das (II)SHP-1 Transkript, welches mit den Aminosäuren MVR beginnt und insgesamt 595 Aminosäuren umfasst [33, 35, 36]. Dennoch kann den Transkripten eine vergleichbare katalytische Aktivität zugesprochen werden [37]. Beide SHP-1 Varianten unterscheiden sich in ihrer Zelllo-

kalisation. Demnach sind die Proteine des (I)SHP-1 Transkriptes im Zellkern lokalisiert. Während die (II)SHP-1 abgeleiteten Proteine im Zytosol auftreten [36].

2.4.1.2 STRUKTUR

In den Kristallstrukturanalysen der Proteintyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 wird die N-SH2-Domäne als allosterischer Regulator der Enzymaktivität dargestellt. Dabei ist im Ligand-freien Zustand eine geschlossene, autoinhibitorische Konformation zu erkennen, bei der die N-SH2-Domäne sehr intensiv mit der PTP-Domäne interagiert (Abb. 5). Diese Wechselwirkung ruft eine Blockierung der Substratbindungstasche des katalytischen Zentrums hervor. Die Kontaktflächen zwischen der flexiblen C-SH2-Domäne und der N-SH2-Domäne bzw. der PTP-Domäne sind weniger ausgeprägt. Erst die Assoziation eines Phosphotyrosin-haltigen Liganden an die N-SH2-Domäne resultiert in der Aktivierung des Enzyms [28, 30].

Im Fall von SHP-1 schließt die N-SH2-Domäne die Reste 1-108 und die C-SH2-Domäne die Reste 116-208 ein. Die katalytische PTP-Domäne formiert sich aus den Aminosäurepositionen 270-532. Beide SH2-Domänen weisen das typische zentrale 4-strängige β -Faltblattmotiv auf, welches auf beiden Seiten von α -Helices flankiert wird. Die beiden Module sind dabei antennenartig oberhalb der PTP-Domäne lokalisiert (Abb. 5). Die Phosphopeptidbindungsstellen der SH2-Domänen präsentieren sich auf der Moleküloberfläche, abgewandt von der PTP-Domäne. Die PTP-Domäne stellt ein α/β -Protein dar, welches aus 12 β -Strängen und 6 α -Helices besteht. Die Kernregion wird aus einem stark gewundenen, 10-strängigen β -Faltblattelement gebildet, welches durch 4 α -Helices auf der konvexen bzw. 2 α -Helices und einer $\beta 5$ - $\beta 6$ Haarnadelstruktur auf der konkaven Seite begrenzt wird. Der Strukturvergleich der Ligand-freien SHP-1 und der Peptid-gebundenen PTP-Domäne (Peptidsubstrate abgeleitet von SIRP α pY⁴⁶⁹, pY⁴⁹⁵) zeigte, dass die Phosphatasedomänen nahezu identisch sind [28, 38]. Geringe Konformationsunterschiede (1,6 Å) konnten auch zwischen der isolierten, freien und der Peptid-gebundenen N-SH2-Domäne der homologen PTPase SHP-2 aufgezeigt werden [39]. Im Bereich der $\beta 5$ - $\beta 6$ Haarnadelstruktur (Reste 356-363) unterscheiden sich beide PTP-Domänen dennoch signifikant. Es wird angenommen, dass diese Region aufgrund der erhöhten Flexibilität eine essentielle

Rolle in der Substraterkennung besitzt [38, 40, 41]. Ähnliche Eigenschaften werden auch den Loop-Regionen, in der Umgebung der Substratbindungsstelle ($\alpha 1$ - $\beta 1$ und $\beta 3$ - $\alpha 2$) zugewiesen [28].

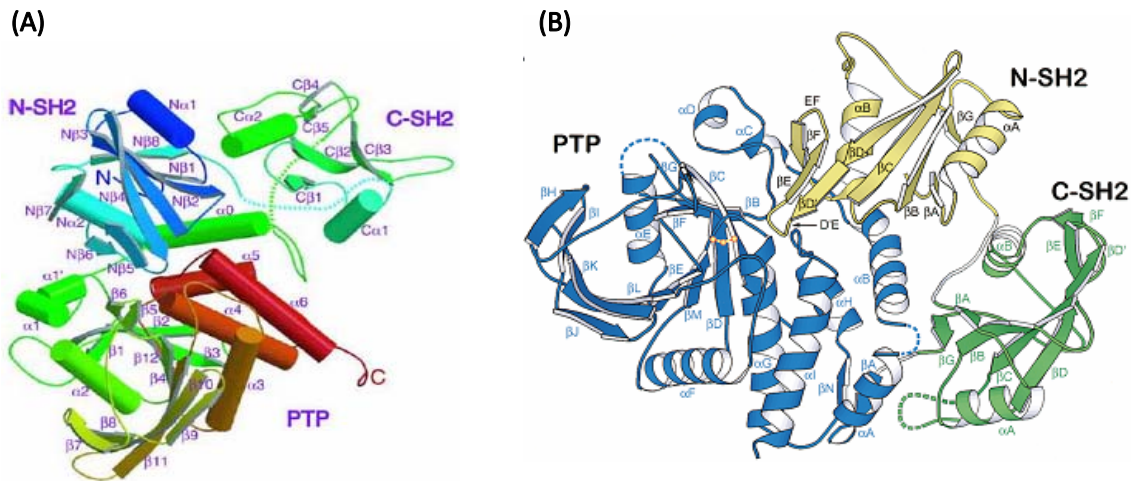


Abb. 5 Kristallstruktur von (A) SHP-1 [28] und (B) SHP-2 [30].

In der autoinhibierten Konformation bilden der $N\beta 4$ - $N\beta 5$ -Loop, der aus der N-SH2-Domäne herausragt und die katalytische PTP-Domäne eine gemeinsame Kontaktfläche aus, die 1478,9 Å umfasst und damit 20% größer ist als bei SHP-2 beschrieben. Diese Berührungsfläche blockiert den Zugang zum aktiven Zentrum und somit das katalytische Nukleophil Cys⁴⁵⁵ am Boden der Substratbindungstasche. Der inaktive Zustand wird durch die Ausbildung von Salzbrücken zwischen Asp⁶¹ und Lys³⁶², π - π -Wechselwirkungen zwischen Phe⁶² und Tyr²⁷⁸ und Wasserstoffbrücken zwischen Ser⁵⁹/His⁴²², Gly⁶⁰/Gln⁵⁰⁶ und Asn⁵⁸/Gln⁵⁰² stabilisiert. Mit Ausnahme des Ser⁵⁹ (Thr in SHP-2) sind diese Reste in SHP-1 und SHP-2 konserviert [28].

Molecular Dynamics Simulationen zeigten, dass die Bindung eines Liganden durch die N-SH2-Domäne (SHP-2) die Flexibilität der C-terminalen Hälfte der Domäne reduziert, was zu einer verminderten Assoziation mit der PTP-Domäne führt [39]. Strukturhomologien lassen darauf schließen, dass der Interaktionsmechanismus zwischen der N-SH2-Domäne und der PTP-Domäne für SHP-1 und SHP-2 ähnlich ist.

Die Linkerregionen zwischen der C-SH2 und N-SH2-Domäne (109-115), sowie C-SH2 und PTP-Domäne (209-231) sind ohne definierte Sekundärelemente angeordnet und konnten deshalb nicht definiert werden.

2.4.1.3 REGULATIONSMECHANISMEN

Verschiedene Formen der Ligandbindung an SHP-1 bzw. die Modifikation des C-Terminus führen zur Dissoziation des autoinhibitorischen N-SH2-PTP-Komplexes (siehe Kapitel 2.4.1.2), was zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität von SHP-1 führt. Dabei ist die Aktivität von SHP-1 (Wildtyp) abhängig von dem pH-Wert und der Ionenstärke. Bei einem pH-Wert von 7,4 ist die Phosphatase inaktiv. Das Optimum der Katalyse von pNPP durch SHP-1 liegt bei pH 5,4, wobei die Effizienz der Dephosphorylierung ($k_{\text{cat}}/K_M \sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) verglichen mit anderen Phosphatasen, wie z.B. LAR, CD45 oder PTP β , relativ gering ist [42]. Ein niedriger pH-Wert trägt zur Änderung der Wechselwirkung zwischen den Aminosäureseitenketten (Asp⁶¹ und Lys³⁶²) innerhalb der Kontaktfläche zwischen der N-SH2-Domäne und der katalytischen Domäne bei. Neben anderen Faktoren, hat diese Änderung Einfluss auf die notwendige Konformationsänderung, die zur Aktivierung des Enzymes führt. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass den SH2-Domänen sowie dem C-Terminus eine regulatorische Funktion bezüglich der SHP-1 Aktivität zugesprochen werden kann. So zeigten N- und C-terminal verkürzte SHP-1 Konstrukte eine 20-40-fach erhöhte SHP-1 Aktivität [43, 44].

Durch verschiedene Prozesse, wie die Bindung von Phosphotyrosin-haltigen Liganden bzw. die Phosphorylierung innerhalb des Moleküls, kann das inaktive Enzym in seine aktive Form gebracht werden.

(I) Bindung eines monophosphorylierten Liganden durch die N-SH2-Domäne

Erste pY-unabhängige Studien unter Verwendung von SHP-1 Mutanten zeigten, dass die Regulation der katalytischen Aktivität von SHP-1 auf Wechselwirkungen zwischen der N-SH2-Domäne und der PTP-Domäne beruht. Demnach zeigte eine um beide SH2-Domänen verkürzte SHP-1 Mutante (SH-PTP1(Δ SH2)) eine normale Michaelis-Menten-Kinetik über den getesteten pH-Bereich von 5,1-7,4. Neben der Phosphotyrosin-unabhängigen Regulation wurden auch der Einfluss von Peptiden, abgeleitet aus der Sequenz des Erythropoietin-Rezeptors (EpoR pY⁴²⁹) und des Interleukin-3-Rezeptors (IL-3R pY⁶²⁸) untersucht. Die Peptide interagierten spezifisch mit der N-SH2-Domäne und stimulierten die Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von ihrer Konzentration [44].

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung eines monovalenten Phosphotyrosin-haltigen Liganden (EpoR pY⁴²⁹, FcγRIIB1 pY³⁰⁹) an die C-SH2-Domäne nur eine geringe Wirkung auf die Aktivierung von SHP-1 ausübt [45].

Auch jüngste Untersuchungen zur Regulation der Phosphataseaktivität unter Verwendung von verschiedenen SHP-1 Konstrukten konnten der C-SH2-Domäne nur einen untergeordneten Einfluss zuschreiben. Dabei wurde in allen Konstrukten der hoch konservierte Argininrest (N-SH2→R³²K; C-SH2→R¹³⁸K), der in der Phosphotyrosinbindungstasche der SH2 Domäne lokalisiert ist, gegen Lysin substituiert [46].

II) Bindung eines biphosphorylierten Liganden durch das Tandem-SH2-Motiv

Inhibitorische Rezeptoren stellen Interaktionspartner für die Proteintyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 dar. Diese Rezeptoren präsentieren in ihrer intrazytoplasmatischen Domäne sogenannte ITIM-Motive („*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*“) mit einer L/I/VxYxxL/V Konsensussequenz [47-49]. Mit Ausnahme des FcγRIIB1 Rezeptors werden die ITIMs als Tandem-Motive exprimiert, die durch einen aus 25-31 Aminosäuren bestehenden Spacer getrennt sind [50]. Die Rekrutierung der Phosphatasen erfolgt nach Phosphorylierung der Tyrosinreste und damit der Aktivierung des Rezeptors. Abbildung 6 stellt mögliche Interaktionen zwischen den ITIMs und den SH2-haltigen Phosphatasen dar. Demnach können beide SH2-Domänen durch ein ITIM-Tandem-Motiv rekrutiert werden (Abb. 6A). Der dimere Lektin-ähnliche Rezeptor präsentiert nach Aktivierung ebenfalls inhibitorische Motive, die durch zwei Rezeptormoleküle dargestellt werden können (Abb. 6B). Diese sind ebenfalls in der Lage das Tandem-SH2-Motiv der Phosphatasen zu rekrutieren. Die Bindung eines biphosphorylierten, bivalenten Liganden (abgeleitet von IRS-1) durch das N-SH2/C-SH2-Motiv von SHP-2 führt verglichen mit monovalenten Phosphotyrosin-haltigen Liganden zu einer stärkeren Stimulation der Phosphataseaktivität. Mutationsanalysen der SH2-Domänen bekräftigten das Mitwirken beider Domänen an der Aktivitätsregulation [51-53].

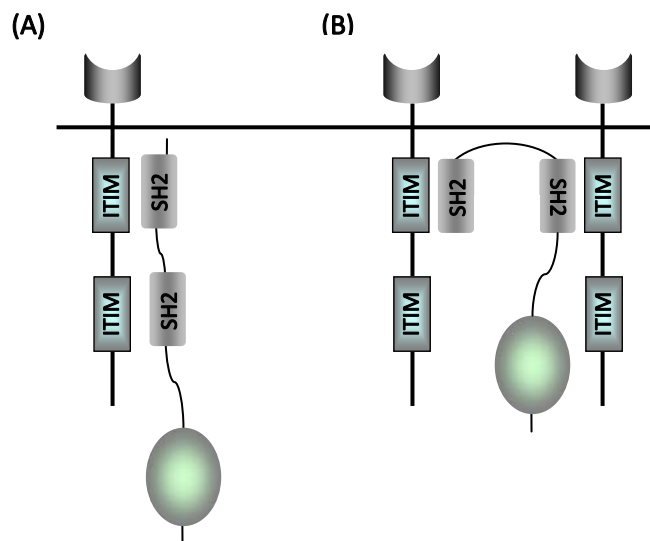


Abb. 6 Regulation der Phosphataseaktivität durch Tandem-ITIMs [nach 47].

Dieser Effekt wird mit der hohen Flexibilität der C-SH2-Domäne begründet, welche antennenartig Phosphopeptide „aufspürt“. Die Bindung des Phosphopeptidliganden zieht einen Konformationswechsel des Enzyms nach sich, bei dem sich die Position der N-SH2-Domäne ändert. Diese Änderung führt zu einer effizienten Bindung des zweiten Liganden, was letztendlich zur Auflösung des autoinhibitorischen Zustandes der Phosphatase führt [28, 30].

(III) Tyrosinphosphorylierung im C-Terminus

Dem C-Terminus der SH2-Phosphatasen wird eine wichtige Rolle für deren Funktion zugesprochen. Verschiedene Mutationsanalysen haben die Bedeutung des *C-tails* unterstrichen. PEI *et al.* zeigten, dass die Kürzung des SHP-1 C-Terminus um 35 Aminosäuren (SH-PTP1(Δ 35)) eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität, im Vergleich zum Wildtyp (SH-PTP1) hervorruft [44]. Die proteolytische Spaltung des C-Terminus resultierte in einer 10-20fach höheren Aktivität von SHP-1 [43, 54].

Die Phosphorylierung der Tyrosinreste (pY^{536/564} (hämatopoetische Form), pY^{538/566} (epitheliale Form)) innerhalb der Sequenz des C-Terminus kann zur direkten Regulation der Phosphataseaktivität führen. Weiterhin ist die Rekrutierung von Signalmolekülen, wie Grb2 und SHIP durch diese Reste möglich [19, 55].

Die Modifikation des Tyrosins kann durch das Wirken von verschiedenen Kinasen realisiert werden. So wurde z.B. die Phosphorylierung der Sequenz um Tyr⁵³⁶ und Tyr⁵⁶⁴ (E-SEY⁵³⁶GNI; EDVY⁵⁶⁴ENL) durch die Leukozyten-spezifische Proteintyrosinkinase Lck beschrieben [56]. *In vitro* Experimente konnten durch den Einfluss der Insulinrezeptor-Kinase das Tyr⁵³⁸ innerhalb des C-Terminus als Phosphorylierungsstelle aufzeigen [57]. Tyr⁵³⁸ liegt dabei innerhalb einer Sequenz ESEY⁵³⁸GNI, die mit der Konsensussequenz der Grb2-SH2-Domäne korreliert. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Position als Andockstelle für Adapterproteine fungiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SHP-1 einer Autodephosphorylierung unterliegt, die durch Natriumvanadat unterdrückt werden kann [58]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen, konnten die Tyrosinreste in den Positionen 538 und 566 durch Substitution gegen Phenylalanin als Phosphorylierungsstellen und Substrate für die Src-Kinase identifiziert werden [59].

Aufgrund der Instabilität der Tyrosinphosphorylierung ist es schwierig, deren Rolle in der Regulation der Enzymaktivität genauer zu beurteilen. Um diesen limitierenden Faktor zu umgehen, wurden durch ZHANG *et al.* semisynthetische SHP-1 Proteine, die nichthydrolysierbare Phosphotyrosin-Mimetika enthalten, generiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Substitution von Tyr⁵³⁶ zu einer 8-fach höheren Phosphataseaktivität führt, während der Austausch in Position 564 eine geringe Aktivitätsänderung (1,6-fach) hervorruft. Diese Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass sich die Erhöhung der enzymatischen Aktivität in einer Interaktion zwischen der N-SH2-Domäne und dem Tyrosinrest in Position 536 begründet [19].

(IV) Lipidbindung

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass SHP-1 ein negativer Regulator der T-Zell-Rezeptor (TCR)-vermittelten Signalwege ist. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zur Phosphorylierung von Signalproteinen (z.B. Lck, ZAP-70), die sich in sogenannten *lipid rafts* befinden bzw. rekrutiert werden. Dabei handelt es sich um Mikrodomänen in der Zellmembran, die verstärkt mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind [60]. Die kurzzeitig anhaltende Phosphorylierung lässt die Vermutung zu, dass Phosphatasen wie SHP-1 innerhalb dieser Mikrodomänen lokalisiert sein müssen (siehe Kapitel 2.4.1.5).

FAWCETT *et al.* konnten zeigen, dass eine SHP-1 Fraktion in den *lipid rafts* exprimiert wird und dass diese Fraktion während der TCR-Stimulation dort verbleibt. Es besteht die Vermutung, dass aufgrund einer fehlenden Lokalisationssequenz dem C-Terminus eine wichtige Rolle in der TCR-Regulation zugeschrieben werden kann [55, 61].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von Phosphatidsäure, Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) und Phosphatidylserin an eine 41 Aminosäuren umfassende Sequenz im C-Terminus die Aktivität von SHP-1 stimuliert wird. Im Gegensatz zu SHP-1 existiert diese hochaffine Bindungsstelle in der verwandten PTP SHP-2 nicht [55, 62].

2.4.1.4 SUBSTRATSPEZIFITÄT

Die Identifizierung und Charakterisierung von physiologisch relevanten Substraten von Proteintyrosinphosphatasen wurde in vorangegangenen Studien intensiv untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass neben chemischen Eigenschaften, auch die Länge der Sequenzen möglicher Substrate eine entscheidende Rolle spielt. Durch Alanin-Substitution innerhalb der Sequenz eines vom EGF-Rezeptor⁹⁸⁸⁻⁹⁹⁸ (*epidermal growth factor*) abgeleiteten Peptides schlugen ZHANG *et al.* eine Konsensussequenz für PTP-Substrate (DADEpYAAPA) vor. Dabei bestand die Vermutung, dass die N-terminal des pY-Restes gelegenen sauren Aminosäuren einen beachtlichen Beitrag zur Substratbindung und Katalyse leisten [40, 63, 64].

Diese Vermutung wurde durch Kristallstrukturanalysen von der mit zwei Peptiden aus SIRP α komplexierten Phosphatasedomäne von SHP-1 (C455S-Mutante) bekräftigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Peptide in gestreckter Konformation an die katalytische Domäne binden. Dabei interagierten 4 basische Aminosäurereste (Lys²⁷³, Lys²⁷⁹, Arg²⁷⁷ und Arg³⁶⁰) mit dem Phosphotyrosinrest innerhalb der pY-Bindungstasche [40]. Neben der ausgeprägten Phosphotyrosinbindungstasche konnten noch 6 weitere Substratbindungstaschen identifiziert werden. Als wichtigste Bindungstasche wurde die P-2-Bindungstasche charakterisiert, die N-terminal (pY-2) des Phosphotyrosinrestes liegt. Diese wird aus den Seitenketten der Aminosäuren Lys³⁶², Arg²⁷⁷ und Tyr²⁷⁸ gebildet. Eine Interaktion zwischen den Resten N-terminal der Position pY-2 und dem $\beta 5/\beta 6$ -Loop konnte

aufgezeigt werden. Dabei wurde der Position pY-4 eine Präferenz für saure Aminosäuren (Glu, Asp) zugesprochen. Die C-terminalen Substratreste wechselwirken primär mit den $\alpha 1/\beta 1$ und $\alpha 5/\alpha 6$ Motiven. Die untersuchten Komplexstrukturen ließen auf die Konsensussequenz (D/E)x(L/I/V)_npYxx(L/I/V) (n = 1, 2) für Substrate der PTP SHP-1 schließen.

Durch das Screenen einer Peptidbibliothek, mit den randomisierten Positionen pY-1 und pY-2 (RNNXXpYA-NH₂, X = proteinogene Aminosäuren mit Ausnahme von Cys) konnte die Konsensussequenz für potentielle SHP-1 Substrate präzisiert werden. Die Präferenz für saure Aminosäuren in Position pY-2 (Asp > Glu) und die Toleranz gegenüber mehrerer Aminosäuren in Position pY-1 resultierte in der Konsensussequenz (D/E)xpY [65].

In Übereinstimmung mit der ermittelten Konsensussequenz detektierten MUSHARRAF *et al.* Sequenzen, die in 63% aller Fälle saure Aminosäurereste in der N-terminalen Region (pY-4 bis pY-1) enthalten und durch die katalytische Domäne von SHP-1 selektiert werden.

Das Screening der Peptidbibliothek (xxxPmpxxx, x = Nle und proteinogene Aminosäuren, außer Cys und Met) identifizierte dabei Sequenzen wie, DYDY, MDDY, VGDD, YDEQ und FDEG. In den Positionen pY+2 und pY+3 konnte ein breites Spektrum an Aminosäuren bestimmt werden. In Position pY+4 zeigte die PTP-Domäne eine starke Präferenz für hydrophobe Reste (V/I/L/M/F/Y) [16].

In einer weiteren Studie wurde die Dephosphorylierung von mono-, bi und triphosphorylierten Peptiden, abgeleitet aus der Aktivierungsschleife der Rezeptortyrosinkinase (RTK) Ros (Reste 1999-2014; pY^{2003, 2007, 2008}) in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Sequenzumgebung des phosphorylierten Tyrosins, sondern auch die Anzahl der Phosphorylierungsstellen eine entscheidende Rolle für die Substratspezifität spielt. Die Dephosphorylierung der triphosphorylierten Sequenz durch SHP-1 ist dabei effizienter als die der bi- und monophosphorylierten Liganden. Außerdem konnte die Präferenz für Aspartat in Position pY-2 gegenüber Glutamat und damit die von WANG *et al.* ermittelte Konsensussequenz (D/E)xpY bestätigt werden [66].

2.4.1.5 BIOLOGISCHE FUNKTIONEN

Zur Aufklärung der biologischen Funktion von SHP-1 konnten Ergebnisse beitragen, die eine „*loss-of-function*“ Mutation im *SHP-1* Gen für schwerwiegende immunologische Dysfunktionen und Störungen der Hämatopoese bei sogenannten *motheaten* (*me/me*) und *viable motheaten* (*me^V/me^V*) Mäusen verantwortlich machten [67-69]. Der *me/me*-Phänotyp ist durch eine geringere Körpergröße, Pigmentstörungen der Haut, Fellverlust und Nekrosen der Extremitäten gekennzeichnet (Abb. 7).

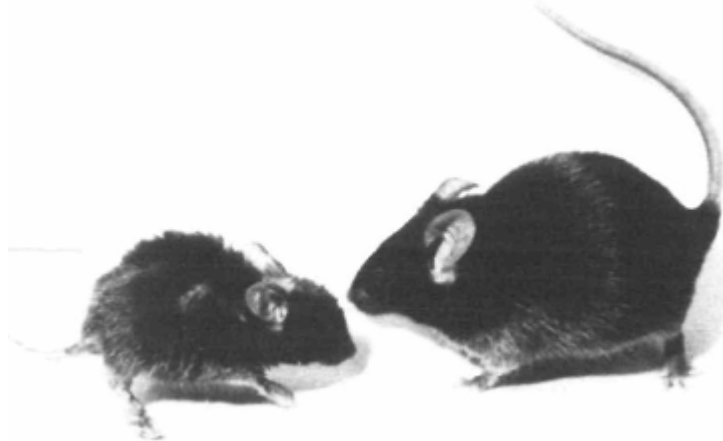


Abb. 7 Vergleich zwischen einer *motheaten* Maus (links) und einer normal entwickelten, gesunden Maus (rechts), 3½ Wochen alt [67].

Beide Punktmutationen haben ein abnormales mRNA Spleißen und die Expression eines aberranten SHP-1 Transkripts zur Folge. Die *me/me*-Mutation beruht auf der Deletion eines Cytidinrestes innerhalb der N-SH2-Domäne, die eine neue Donorspleißstelle schafft. Dadurch kommt es zur Verschiebung des Leserasters und zum vorzeitigen Abbruch der mRNA-Synthese. Im Vergleich zum *wild-type* Protein besteht das resultierende SHP-1 Transkript aus nur etwa 100 Aminosäuren.

Die Transversion von Thymin zu Adenin ist Ursache der *me^V/me^V*-Mutation, die den Verlust einer Donorspleißstelle zur Folge hat. Die Aktivierung kryptischer Spleißstellen führt zur Insertion oder Deletion von Basenpaaren innerhalb der Sequenz der PTP-Domäne, was zur Produktion eines zum Wildtyp katalytisch inaktiveren Proteins führt (~20% Aktivität) [6, 68-71]. Die aberranten Transkripte führen zu hämatopoetischen Störungen, die durch eine erhöhte Expansion und eine vermehrte Anreicherung von myeloiden Zellen in verschiedenen Geweben geprägt sind. Dies kann zu hämorrhagischer Pneumonitis, Sple-

nomegalie und extramedullärer Hämatopoese führen, was die kurze Lebensdauer der Mäuse (me/me ca. 2-3 Wochen, me^V/me^V-Mäuse ca. 9-12 Wochen) begründet [67, 72].

SHP-1 und die Regulation myeloider Zellfunktionen

Die Zellen der myeloiden Reihe (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten) können durch Interaktionen mit chemotaktischen Peptiden, Zytokinen, Chemokinen und einer Vielzahl von anderen Liganden aktiviert werden. Die dadurch hervorgerufene Induktion von Signalkaskaden führt letztlich zur Proliferation, Chemotaxis, Phagozytose, Adhäsion und zur Sekretion von granulären Vesikeln [73-77]. Den Proteintyrosinphosphatasen wird bei der Regulation der Signalwege eine wichtige Rolle zugeschrieben, was durch die SHP-1-defizienten *motheaten* Mäuse gezeigt werden konnte. SHP-1 übt dabei eine Hemmung auf die Signalkaskaden aus, die das Wachstum, die Differenzierung und die Aktivierung von myeloiden Zellen fördern [78]. Weiterhin ist SHP-1 an der Regulation der adhäsiven Eigenschaften von myeloiden Zellen beteiligt [79].

Verschiedene Funktionsanalysen machten deutlich, dass SHP-1 an der Downregulation verschiedener Signalkaskaden beteiligt ist. Dazu zählen Signalwege, die durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. c-KitR [80, 81]) und Zytokin-Rezeptoren, wie den Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor-Rezeptor (GM-CSFR) [82], den Makrophagen koloniestimulierender Faktor-Rezeptor (M-CSFR) [83] und den Interleukin-3-Rezeptor (IL-3R) [84, 85] gesteuert werden. Dabei ist SHP-1 in der Lage, die durch diese Rezeptoren transduzierten Signalwege direkt durch Dephosphorylierung bestimmter Rezeptorkomponenten bzw. indirekt durch die Regulation von Jak-Kinasen zu lenken. Im Zusammenhang mit der SHP-1-Defizienz konnte ein erhöhtes zelluläres Phosphorylierungslevel nach Stimulation des M-CSFR und IL-3R gezeigt werden [70, 84].

Weiterhin konnte die Vermittlung der Effekte von SHP-1 auf die Physiologie myeloider Zellen, der Assoziation zwischen SHP-1 und ITIM-enhaltenden inhibitorischen Rezeptoren, wie LIR-1, LIR-2, SHPS-1-R und PIR-B zugeschrieben werden.

Bei der Co-Stimulation von Todesrezeptoren neutrophiler Granulozyten mit anti-apoptotischen Liganden (GM-CSF, G-CSF oder IFN- γ) und pro-apoptotischen Liganden (Fas oder TNF- α) konnte gezeigt werden, dass durch die Rekrutierung von SHP-1 an ein ITIM-

ähnliches YxxL-Motiv innerhalb der Todesdomäne anti-apoptotische Zytokinsignale unterdrückt werden. Folglich werden wichtige anti-apoptotische bzw. pro-inflammatorische Signalmoleküle, wie z.B. Lyn, PI3K, Vav, Grb2 und Tyk-2 dephosphoryliert und inaktiviert [91-97].

Mit der Identifizierung der Bindungsstelle (pY^{429}) von SHP-1 innerhalb der zytosolischen Domäne des aktivierten Erythropoetin-Rezeptors (EPO-R) konnte der Proteintyrosinphosphatase eine wichtige Rolle in der Regulation der Erythropoese zugeordnet werden. Die SH2-Domänen-abhängige Aktivierung der Phosphataseaktivität resultiert in der Dephosphorylierung und Inaktivierung der Rezeptor-assoziierten Januskinas Jak-2 [98]. JIAO *et al.* konnten eine direkte, SH2-unabhängige Interaktion zwischen SHP-1 und Jak2 aufzeigen, die ebenfalls über die Dephosphorylierung zur Inaktivierung der Tyrosinkinase führt. Die Untersuchung der SHP-1 Aktivität, unter Verwendung von Mutanten (R30K, R136K) machte jedoch deutlich, dass die SH2-abhängige Interaktion von SHP-1 mit dem EPO-R die Dephosphorylierung von Jak2 potenziert [99].

SHP-1 und die Regulation lymphatischer Zellfunktionen

B- und T-Zell-Rezeptoren (BCR bzw. TCR) stellen multimere Komplexe dar, die ein Erkennungsmodul (Peptid-, MHC- oder Antigenerkennung) sowie ein Signalmodul, bestehend aus transmembranen Untereinheiten (TCR: CD3 γ , δ , ϵ und TZR ζ ; BCR: Ig- α und Ig- β) enthalten. Die Antigenbindung führt zur Aktivierung von Proteintyrosinkinasen der Src-Familie (TCR: Lck und Fyn; BCR: Lyn, Fyn und Blk), was zur Phosphorylierung sogenannter ITAMs-Motive („*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*“, YxxLx₍₆₋₈₎YxxL) innerhalb der zytosolischen Region des Rezeptors führt. Die ITAMs generieren Bindungsstellen für SH2-haltige Proteintyrosinkinasen, wie Syk und ZAP-70 [100, 101]. Die Phosphorylierung des Scaffold-Proteins BLNK/SLP-65 durch Syk hat dabei die Aktivierung der MAPK und die Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern zur Folge (Abb. 8) [6, 102]. Die Wirkung von Proteintyrosinphosphatasen auf diese Signalwege hat entweder die Verstärkung (CD45) oder die Termination (SHP-1) der Lymphozytenaktivierung zur Folge [6, 103]. Die inhibitorische Wirkung von SHP-1 konnte durch Untersuchungen an *motheaten* Mäusen belegt werden, die eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung, die

Aktivierung der MAPK sowie eine beachtliche Zunahme der B-Zellproliferation, als Folge der BCR-Stimulation zeigten [104]. In SHP-1-defizienten B-Zellen ist die BCR-vermittelte Apoptose im Vergleich zum Wildtyp erhöht, was als weiterer Nachweis für den negativen Effekt von SHP-1 diente [104-107].

SHP-1 moduliert den BCR über eine Vielzahl molekularer Interaktionen. In ruhenden B-Zellen assoziiert SHP-1 konstitutiv an den BCR und dephosphoryliert die Ig- α /Ig- β -Ketten des Rezeptors [104]. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor führt zur Dissoziation des Komplexes. SHP-1 wird an verschiedene Stellen innerhalb der Zelle rekrutiert. Hierbei spielen hauptsächlich die ITIM-haltigen Co-Rezeptoren eine wichtige Rolle (Abb. 8). Durch die Interaktion mit SHP-1 kommt es zur Modifikation von bestimmten Signalen, z.B. durch die Dephosphorylierung von Syk und ITAMs [6, 108-110]

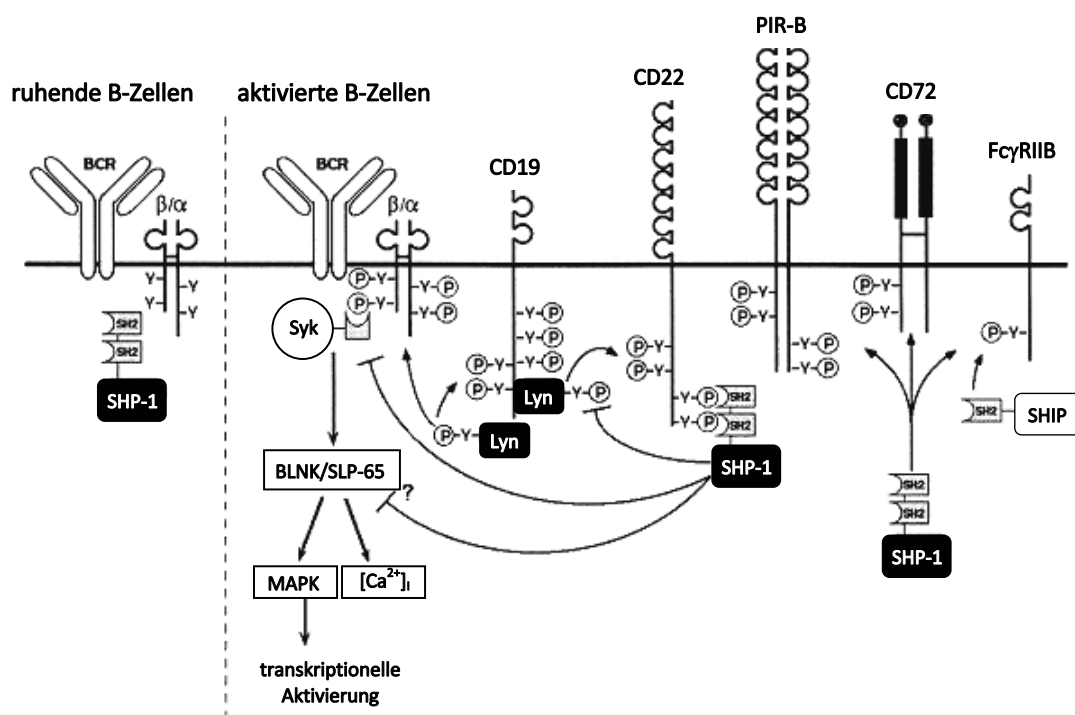


Abb. 8 Regulation BCR-initiierten, intrazellulären Signalwege über SHP-1 [nach 6].

Die Funktion von T-Zellen wird über Antigen-spezifische Rezeptoren und Co-Rezeptoren reguliert. Wie auch im Fall des B-Zellrezeptors wird die T-Zellfunktion, wie Thymozytenselektion und TCR-induzierte Apoptose durch die Wirkung von SHP-1 moduliert.

„*Moth eaten*“ T-Zellen zeigten nach TCR-Stimulation im Vergleich zum Wildtyp sowohl eine gesteigerte proliferative Antwort als auch eine Zunahme der IL-2 Produktion [103, 111, 112].

Der Effekt von SHP-1 auf die TCR-Signalweiterleitung wird durch eine Vielzahl von molekularen Interaktionen realisiert. SHP-1 interagiert mit dem TCR selbst und ist dabei in der Lage die phosphorylierten ITAMs innerhalb der CD3 ϵ -Untereinheit des aktivierten TCR zu dephosphorylieren [113]. Die Assoziation von inhibitorischen Rezeptoren der Killer-Zellen (KIRs), wie p58, p70 oder CD94/NKG2A führt zu einer starken Hemmung der Zytolyseaktivität und der Zytokinproduktion von zytotoxischen T-Zellen [114-117].

Die Bindung von MHC-Klasse-1-Molekülen an KIRs resultiert in der Rekrutierung von SHP-1-SH2-Domänen an die ITIM-Motive inhibitorischer Rezeptoren, was zur Negativregulation der TCR-induzierten Aktivierung der Src-Kinasen Lck und Fyn sowie der Dephosphorylierung der Syk-Kinasen ZAP-70 und Syk führt. So wird die Syk-vermittelte T-Zell-Toxizitätsaktivität vollständig gehemmt [112, 118, 119].

Die SHP-1 Assoziation an KIR ruft auch die Dephosphorylierung von SLP-76, einem direkten Substrat von Syk und SHP-1 hervor. Durch das Entgegenwirken der Syk-vermittelten Phosphorylierung von SLP-76 wird die zytotoxische T-Zellfunktion gestört [119].

Weitere ITIM-Bindungsstellen für SHP-1 generiert der inhibitorische Rezeptor PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*) [120].

Neben ITIM-haltigen Rezeptoren, werden auch ausgewählte Zytokinrezeptoren der T-Lymphozyten, wie der IL-2-Rezeptor (IL-2R) durch SHP-1 in ihrer Funktion beeinflusst [121]. FAWCETT *et al.* zeigten, dass 20-30% des zellulären SHP-1 Gehaltes in *lipid rafts* lokalisiert ist (siehe Kapitel 2.4.1.3). SHP-1 wirkt dabei als Negativregulator TCR-vermittelter Signale, was durch den Verlust der Phosphorylierung der CD3 γ Kette, der fehlenden Rekrutierung von ZAP-70 an den TCR/CD3-Komplex und der Hemmung der IL-2 Produktion nach Rezeptorstimulation bekräftigt wird [61].

Weiterhin wurden Interaktionen zwischen SHP-1 und verschiedenen anderen Signaleffektoren, wie Vav, Grb2 und mSos1 detektiert [96].

SHP-1 und die Regulation epithelialer Zellfunktionen

Im Vergleich zu hämatopoetischen Zellen ist die Expressionsrate von SHP-1 in epithelialen Zellen geringer. Außerdem weist das in diesen Zellen exprimierte 597 Aminosäuren enthaltene SHP-1 Transkript ((I)SHP-1) eine veränderte Initialsequenz auf (siehe Kapitel 2.4.1.1) [33, 35]. Als epitheliale Interaktionspartner sind u.a. die transmembrane Tyrosinkinase Ros und der EGF-Rezeptor beschrieben worden [53, 122].

Die Sterilität männlicher me^V/me^V -Mäuse beruht auf einer gestörten Spermienreifung, die mit einer verminderten Differenzierung der Epididymis korreliert. Die Ähnlichkeiten zum Phänotyp der $Ros^{-/-}$ Mäuse, in denen eine gezielte Inaktivierung der Rezeptortyrosinkinase Ros beschrieben wurde, gab den Anlass die molekularen Grundlagen dieser Erscheinungen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass SHP-1 über seine N-SH2-Domäne direkt an Ros (LNpY²²⁶⁷MVL-NH₂, LNpY²³²⁷ACL) bindet. Jedoch präsentiert sich pY²³²⁷ als schlechtes Ros-Substrat und leistet daher nur einen geringen Beitrag für die SHP-1 Bindung [123]. Weiterhin wurde Ros als negativer Regulator der Ros-vermittelten Signalwege beschrieben. In me^V/me^V -Mäusen liegt Ros hyperphosphoryliert vor. Phosphoryliertes Ros stellt nicht nur einen Bindungspartner für SHP-1 dar, sondern fungiert auch als Substrat von SHP-1. Die Dephosphorylierung von Ros durch SHP-1 führt zur Reduzierung der katalytischen Aktivität der RTK, was eine verminderte Rekrutierung von Substratproteinen bewirkt [122].

In humanen, epithelialen Tumorzellen konnte eine Assoziation zwischen dem EGFR und SHP-1 beschrieben werden. Die Behandlung des EGFR-SHP-1 Komplexes mit Phosphatidsäure initiierte dabei die Dephosphorylierung des autophosphorylierten Rezeptors [124]. TENEV *et al.* identifizierten sowohl die N- als auch die C-SH2-Domäne als Strukturelemente, die an der EGFR-SHP-1 Interaktion beteiligt sind [53]. Die Analyse von Y→F-Mutanten des EGFR schlug pY¹¹⁷³ als Bindungsstelle für die N-SH2 Domäne von SHP-1 vor. Der Bindungspartner für die C-SH2-Domäne wurde nicht identifiziert [125].

Das Zell-Adhäsionsprotein p120 Catenin (p120^{ctn}) wurde als weiterer Bindungspartner und als Substrat von SHP-1 beschrieben [126]. TENEV *et al.* zeigten, dass es nach EGF-Stimulation von A431 Zellen zu einer SHP-1-vermittelten Senkung des EGFR Phosphorylierungslevels und zur verringerten DNA-Bindungsaktivität von Stat1 und Stat3 führt [127].

Im C-terminalen Bereich der epithelialen Form von SHP-1 konnte eine nukleare Lokalisationssequenz (NLS) ermittelt werden, die aus dem basischen KRK-Motiv gebildet wird. In ruhenden Zellen wird das NLS-Signal wahrscheinlich unterdrückt, da erst die EGF-Stimulation die Translokation von SHP-1 vom Zytosol in den Zellkern hervorruft [128]. DUCHESNE *et al.* konnten die Kernlokalisationfähigkeit von SHP-1 in intestinalen Epithelzellen stärken. Durch die Bindung und Dephosphorylierung von β -Catenin durch SHP-1 im Zellkern wurde die β -Catenin/TCF-induzierte Transkription inhibiert und die Proliferation dieser Zellen moduliert. Eine erhöhte SHP-1 Aktivität korrelierte mit dem Zellzyklusarrest und der induzierten Zelldifferenzierung [129].

2.5 DIE SH2-PROTEINDOMÄNEN

Mit der Strukturaufklärung der *Fujinami sarcoma virus* P130^{gag-fps} Proteintyrosinkinase durch insertionelle Mutagenese-Experimente gelang es einen ca. 100 Aminosäure umfassenden Bereich, N-terminal der Kinasedomäne gelegen zu charakterisieren [130]. Aufgrund der Domänenorganisation der Src-Kinasen benannten PAWSON *et al.* diesen an die Kinasedomäne (SH1) angrenzenden Abschnitt „SH2-Domäne“. Das menschliche Genom codiert für etwa 120 SH2-Domänen, die sich auf ca. 110 Proteine verteilen [131]. Die hoch konservierten SH2-Domänen stellen Interaktionsmodule dar, die imstande sind Phosphotyrosinreste zu erkennen und intrazelluläre Signalwege zu regulieren.

2.5.1 STRUKTUR VON SH2-DOMÄNEN

Die Kernregion der SH2-Domänen wird aus einem 7-strängigen β -Mäander gebildet, der sich aus einem 4-strängigen (β B, β C, β D und β G) und einem 3-strängigen (β D', β E und β F) β -Faltblatt-Motiv zusammensetzt. Beide Sekundärstrukturen sind durch den β D-Strang miteinander verbunden. Das 4-strängige Motiv wird auf beiden Seiten von α -Helices (α A und α B) flankiert. Dabei sind die Position und die relative Orientierung der α -Helices und des 4-strängigen β -Faltblatts hoch konserviert. Zwischen der α -Helix B und dem β -Strang G kommt es zur Ausbildung der sogenannten BG-Schleife. Die sogenannte EF-Schleife formiert sich zwischen den β -Strängen E und F (Abb. 9).

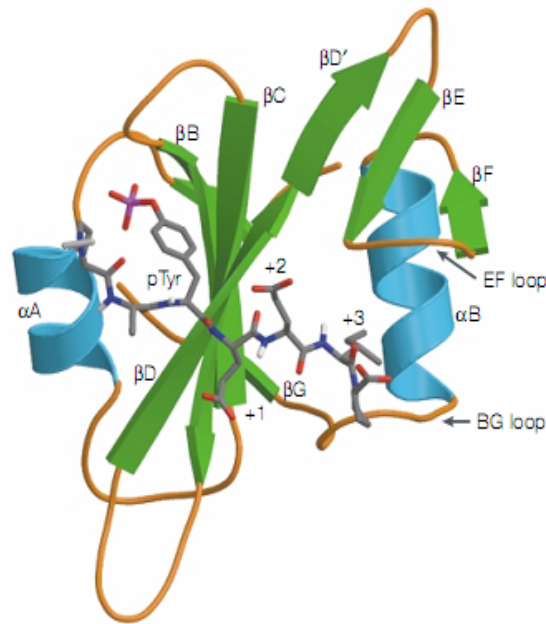


Abb. 9 Kristallstruktur der SH2-Domäne im Komplex mit einem Phosphopeptidliganden [132].

Beide Schleifen sind an der Ausbildung einer hydrophoben Bindungstasche beteiligt, mit der die C-terminal zum Tyrosinrest gelegenen Aminosäuren des Liganden interagieren. Dabei ist der hydrophobe Charakter der Tasche in den SH2-Domänen konserviert. Jedoch variiert die Konformation des 3-strängigen β -Faltblatts und der EF- und BG-Schleife in verschiedenen SH2-Domänen. Diese Variationen sind für die hohe Ligandenspezifität der SH2-Domänen verantwortlich [133, 134].

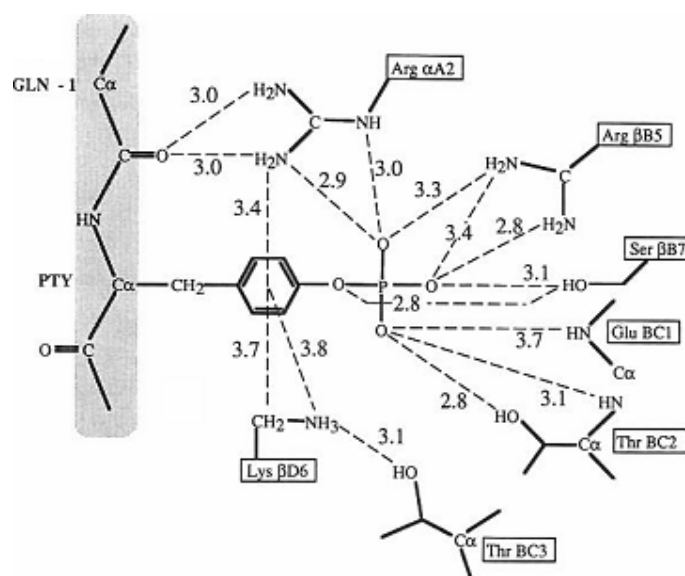


Abb. 10 Schematische Darstellung der Phosphotyrosin-Bindung durch die Src-SH2-Domäne [133].

Die Bindung des Phosphotyrosinrestes wird durch die positiv geladenen Reste Arg α A2, Arg β B5 und Lys β D6 realisiert. Zusätzlich wirken Aminosäuren der Phosphat-Bindungsschleife (BC-Schleife) durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken an der Bindung mit (Abb. 10) [133, 135]. Arg β B5 ist Teil des charakteristischen Signaturmotivs FLV β RES der SH2-Domänen und stellt einen hoch konservierten Rest dar [136, 137]. Der Austausch des Argininrestes durch Lysin führte zur Hemmung der Ligandbindung [52, 138].

2.5.2 BINDUNGSPARTNER DER SH2-DOMÄNEN VON SHP-1 UND SHP-2

Erste Hinweise, dass die Erkennung von Phosphotyrosinresten durch SH2-Domänen von der Primärstruktur des Bindungspartners abhängig ist, lieferte der Sequenzvergleich zwischen dem Polyomavirus middle T Antigen und dem PDGF-Rezeptor. Beide Proteine enthalten die für die SH2-Domäne der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) entscheidende Erkennungssequenz pY-Met/Val-X-Met, die auch innerhalb anderer Interaktionspartner der PI3-K nachgewiesen worden ist.

Mit dem Screening einer Phosphopeptidbibliothek konnte bereits 1993 eine Methode entwickelt werden, die die Vorhersage optimaler und spezifischer Erkennungsmotive individueller SH2-Domänen erlaubte. Dabei wurden den C-terminal vom Tyrosinrest gelegenen Aminosäureresten eine wichtige Rolle in der Spezifitätsregulation der SH2-Domänen zugesprochen [139, 140]. Die SH2-Domänen der Src-Familie bevorzugten dabei das Motiv pYEEI. Die Kristallstruktur der Peptid-komplexierten Src-SH2-Domäne führte zur Aufklärung der Selektion dieses Motives. Während die Reste in pY+1 (Glu) und pY+2 (Glu) auf der Oberfläche der SH2-Domäne lokalisiert sind und dort Kontakte mit den Seitenketten der Domäne ausbilden, bindet der Rest in pY+3 (Ile) in eine hydrophobe Bindungstasche (siehe Kapitel 2.5.1). Der Aminosäurerest β D5, der sich am Boden der Bindungstasche befindet ist entscheidend an der Selektivität beteiligt. Aufgrund der Aminosäure in Position β D5 teilten SONGYANG *et al.* die SH2-Domänen in 4 Gruppen ein. Die SH2-Domänen von Proteinen, wie PLC γ , p85 PI3-K sowie der PTPs SHP-1 und SHP-2 wurden einer Klasse zugeteilt, die sich hinsichtlich ihrer Selektivität von den SH2-Domänen anderer Proteine, wie z.B. der Src-Familie, Vav, Syk oder ZAP-70 unterscheiden. Für Liganden bzw. Bindungspartner der SH2-Domänen dieser Klasse wurde ein allgemeines Motiv (pY-

hydrophob-x-hydrophob; x = alle Aminosäuren, außer Trp und Cys) selektiert [139, 141]. Die Untersuchungen an intrazellulären Interaktionspartnern ließen vermuten, dass es weitere Spezifitätsunterschiede der SH2-Domänen innerhalb einer Klasse geben muss. Im Fall von SHP-2 zeigten Bindungsstudien unter Verwendung von Phosphopeptiden, abgeleitet aus der Sequenz der β -Untereinheit des PDGF-Rezeptors (DTSSVLpY¹⁰⁰⁹TAVQPN), dass für eine hochaffine Bindung eine minimale Sequenz von sechs Aminosäuren (VLpY¹⁰⁰⁹TAV) erforderlich ist. Die Durchführung eines systematischen Alanin-Scans zeigte, dass neben den Aminosäuren in den Positionen pY+1 und +3 auch die Aminosäure in Position pY-2 eine entscheidende Rolle in der Erkennung und Bindung von Liganden spielt [142]. Das Bindemotiv (I/V/L)xYxx(L/V) konnte anhand des Sequenzalignments der inhibitorischen Rezeptoren CD22, Fc γ RIIB und KIR identifiziert werden und ließ die Vermutung zu, dass die Aminosäuren N-terminal von pY einen wichtigen Beitrag für die Assoziation und Aktivierung von SHP-1 leisten. BURSHTYN *et al.* zeigten, dass hydrophobe Reste in pY-2 von der C-SH2-Domäne selektiert werden [143]. Die Spezifität in Position pY-2 konnte auch für die N-SH2-Domäne von SHP-1 nachgewiesen werden [144].

Das Screening einer kombinatorischen Phosphopeptidbibliothek mit fünf randomisierten Positionen (xxpYxxx) machte deutlich, dass sich die SH2-Erkennungssequenzen der PTPs SHP-1 und SHP-2 unterscheiden (Tab. 1).

Tabelle 1: Konsensussequenzklassen der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 (M = Nle),
^[a] [144], ^[b] [145].

SHP-1	N-SH2	C-SH2
Klasse I	LxpY(M/F)x(F/M) ^a	(T/V/I)xpY(Abu/A/T)x(L/M/V) ^b
Klasse II	LxpYAxL ^a	
SHP-2	N-SH2	C-SH2
Klasse I	(I/L/V/M)/xpY(T/V/A)x(I/V/L/F) ^b	(T/V/I/Y)xpY(A/S/T/V)x(I/V/L) ^b
Klasse II	W(M/T/V)pY(Y/R)(I/L)x ^b	
Klasse III	(I/V)xpY(L/M/T)Y(A/P/T/S/G) ^b	
Klasse IV	(I/V/L)xpY(F/M)xP ^b	

Für die N-SH2-Domäne von SHP-1 konnten zwei Klassen von Peptiden ermittelt werden, wobei sich beide Klassen in den C-terminalen Resten unterscheiden. Die Testung ausgewählter Peptide beider Klassen zeigte trotz Unterschieden im Bindungsverhalten eine

ähnliche Affinität zur N-SH2-Domäne und waren in der Lage die Phosphatase zu aktivieren. Aufgrund der vier beschriebenen Klassen für die N-SH2-Domäne von SHP-2, ist die Bindung von Liganden durch die Domäne, im Vergleich zur N-SH2-Domäne von SHP-1 weniger spezifisch. Für die C-SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 wurde je eine Klasse charakterisiert, deren Peptide spezifisch an die jeweilige Domäne binden [144, 145].

Die experimentell ermittelten Konsensussequenzen für die SH-2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 konnten durch eine Vielzahl von natürlichen Interaktionspartnern bestätigt werden (Tab. 2).

Tabelle 2: Auswahl humaner Interaktionspartner der Proteintyrosinphosphatasen SHP-1 und/oder SHP-2

Interaktionspartner	Sequenz(en)	Referenz
Bgp1 (CD66, CEACAM-1)***	VTYSTL, IYSEV	[146]
G6b (MHC III-Protein)***	LLYADL, TIYAVV	[147]
CD84***	TIYTYI, TVYSEV	[148]
CD150**	TIYAAQV, TVYASV	[149]
c-Kit (SCF-R)*	YVYIDP	[81]
EGFR*	AEYLRV	[53, 125]
Epo-R*	AEYLRV	[44, 73, 150]
FcγRIIB*	ITYSLL	[151-155]
IL3-R*	LEYLCL	[84, 156, 157]
ILT-2 (MIR-7)*	VTYAEV, VTAAQL	[86]
ILT-3 (LIR-5)*	VTYAKV, VTAAQL	[158]
ILT-5 (LIR-3)*	VTYAPV, VTAAQL	[158]
IRp-60 (IRC-1)***	LHYANL, VEYSTV, LHYASV	[159]
KIR 2DL1 (p58, NKAT-1)***	VTYTQL, IVYTEL	[160, 161]
KIR 3DL1 (p70, NKB-1, NKAT-3)***	VTAAQL, ILYTEL	[162]
p120 ^{ctn} *	RGYELL, RIYISL	[126]
PILRα (FDF03)***	IVYASL, TLYSVL	[163, 164]
Ros*	LNVMVL, LNYACL	[122]
SIRPα (SHPS-1, BIT, MyD-1, PTPNS1)***	ITYADL, TEYASI, LTYADL	[165, 166]

* Interaktion mit SHP-1-SH2, ** Interaktion mit SHP-2-SH2.

*** Interaktion mit SHP-1-SH2 und SHP-2-SH2

Eine Vielzahl von Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass die C-terminal der Position pY+3 gelegenen Reste einen Einfluss auf die Spezifität und die Bindungsaffinität der SH2-Domänen haben. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die C-terminale Ver-

längerung von Peptiden zu einer 2-fach höheren Bindungsaffinität der SH2-Domänen von SHP-2 im Vergleich zur minimalen Konsensussequenz führt [142, 167].

Einen beachtlichen Beitrag zur Aufklärung der Bindungsspezifitäten der N- und C-terminalen SH2-Domänen der PTPs SHP-1 und SHP-2 leisteten IMHOF *et al.* mit dem Screening einer kombinatorischen Phosphopeptidbibliothek (AAx¹NpYx²Qx³x⁴x⁵x⁶LNBBRM). Im Gegensatz zu den Positionen pY+1 und pY+3, die eine Spezifität für einzelne Aminosäuren aufweisen, sind die Domänen beider Phosphatasen in pY+4 bis pY+6 weniger spezifisch und selektieren in diesen Positionen eher Aminosäuregruppen. Dabei konnte eine generelle Bevorzugung von hydrophoben und/oder basischen Aminosäuren in den Positionen C-terminal von pY+3 gefunden werden, wobei bestimmte Motive, wie z. B. WYG, WHR oder MFP eine sehr starke Sequenzkovarianz besitzen [168].

Die N-SH2-Domäne von SHP-1 bevorzugt große hydrophobe Reste (Trp, Tyr, Phe, Leu oder Ile) oder positiv geladene Aminosäuren (Arg, Lys oder His) in pY+4. Ähnliche Aminosäuren werden in Position pY+5 selektiert, wobei hier die positiv geladenen Aminosäuren Arg, Lys und His gegenüber den hydrophoben Resten Trp, Tyr, Phe und Pro bevorzugt sind. Im Vergleich dazu wird in pY+6 eine große Vielzahl von Resten akzeptiert, wobei eine Präferenz für positiv geladene Reste beschrieben wurde. Eine vergleichbare Spezifität für hydrophobe aromatische Reste (Trp, Tyr und Phe) wurde für die N-SH2-Domäne von SHP-2 in den Positionen pY+4 und pY+5 des Liganden gefunden. In pY+6 werden kleine Reste, wie Pro, Gly, Ala, Ser und Thr und basische Aminosäuren wie Arg und His bevorzugt. Der Hauptunterschied beider N-SH2-Domänen liegt darin, dass SHP-2 in den Positionen pY+4 und pY+5 keine positiv geladenen Reste mit Ausnahme von His selektiert. Dieser Spezifitätsunterschied ist anhand der Kristallstruktur von SHP-1 und SHP-2 zu erklären. Die Ausbildung der Bindungstasche für pY+4 und pY+5 wird durch die α -Helix B (Taschenboden) und den EF- und BG-Schleifen (Taschenwände) realisiert. Die Seitenketten der positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin können hydrophobe Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche ausbilden. Weiterhin können sie mit den negativ geladenen Resten innerhalb der SH2-Domäne interagieren. Die beschriebenen Motivunterschiede innerhalb der BG-Schleife (SHP-1 N-SH2: LQDRDG; SHP-2 N-SH2: LKEKNG) erklären die Präferenz der N-SH2 Domäne von SHP-1 für Reste wie Arg, Lys oder His [28, 168, 169]. Weiterhin konnte

eine mit der SHP-1 N-SH2-Domäne vergleichbare Spezifität für die beiden C-SH2-Domänen gezeigt werden. Die Studie bestätigt, dass die Positionen pY+4 und pY+5 eine entscheidende Rolle in der spezifischen Erkennung von Liganden durch die SH2-Domänen der PTPs SHP-1 und SHP-2 spielen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass subtile Spezifitätsunterschiede zwischen den SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 bestehen.

2.5.3 EFFEKTOREN DER SH2-INTERAKTIONEN VON SHP-1

Die Entwicklung von biologisch aktiven Phosphopeptidanaloga, abgeleitet von physiologisch relevanten Interaktionspartnern der SH2-Domänen, ist im Hinblick auf die Modulation von zellulären Signalwegen von großem Interesse. Die epitheliale Rezeptortyrosinkinase Ros wurde als hochaffiner Bindungspartner der N-SH2-Domäne von SHP-1 beschrieben [122]. Die Sequenz um den Phosphotyrosinrest pY²²⁶⁷ (EGLNpY²²⁶⁷MVL) der RTK Ros diente IMHOFF *et al.* als Leitstruktur, um strukturelle Anforderungen der N-SH2-Domäne von SHP-1 an deren Liganden zu charakterisieren.

Basierend auf der Konsensussequenzklasse I (LxpY(M/F)x(F/M); M = Nle) wurde die lineare Ros-Sequenz in den Positionen pY+1 bis pY+3 modifiziert. Um hochaffine und spezifische Liganden zu entwickeln, wurde in einem weiteren Schritt versucht, die Flexibilität der linearen Liganden zu reduzieren. Die konformationelle Restriktion erfolgte durch den Einbau nichtproteinogener, abbaustabiler Phenylalaninanaloga, wie α -Amino- β -phenylbuttersäure (Abu(β Ph)), β -Phenylserin (Ser(β Ph)) und Homophenylalanin (Hfe) [170-173] sowie konformationell eingeschränkter Aminosäuren, wie 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic) [174, 175] in die Positionen pY+1 und pY+3 [176]. Die Substitution des Methioninrestes in Position pY+1 durch hydrophobe, aromatische Aminosäuren, wie z.B. Phe, L-*threo*-Abu(β Ph) und der dem Methionin isosteren Aminosäure Norleucin (Nle) brachte im Vergleich zur Leitstruktur hochaffine und stärker aktivierende Liganden für die N-SH2-Domäne von SHP-1 hervor. Der Einbau von L-*threo*/erythro-Abu(β Ph), L-*threo*-Ser(β Ph) und Hfe in pY+3 führte zu ähnlichen Ergebnissen [177].

Weiterhin konnte die lineare Leitsequenz durch Zyklisierung konformationell fixiert werden. Die Bindung von Ros pY²²⁶⁷ (EGLNpY²²⁶⁷MVL) an die SH2-Domäne erfolgt in einer ge-

streckten Konformation, wobei die Reste in den Positionen pY-2 (Leu), pY+1 (Met) und pY+3 (Leu) sowie der Phosphotyrosinrest in intensivem Kontakt mit der Proteindomäne sind (Abb. 11) [141]. Um die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren nicht zu beeinflussen, wurden daher die Positionen pY-1 und pY+2 für den Ringschluss der zyklischen Liganden vorgeschlagen [176]. Die zyklischen Peptide erwiesen sich als hochaffine Liganden, die jedoch im Phosphatase-Aktivitätstest sehr viel geringer aktiv waren als das Leitpeptid. Nachfolgende Konkurrenzexperimente zeigten, dass die zyklischen Liganden die Ros pY²²⁶⁷-vermittelte SHP-1 Aktivierung partiell inhibierten [177].

Zur Klärung des inhibitorischen Verhaltens der zyklischen Liganden wurde eine 2. Serie von SH2-Liganden dargestellt. Die Liganden enthielten in den für die Bindung an die SH2-Domäne essentiellen Positionen die ermittelten optimalen Aminosäurereste. Im Unterschied zur ersten Serie wurden hierbei hochaffine, superaktivierende SH2-Liganden generiert [46].

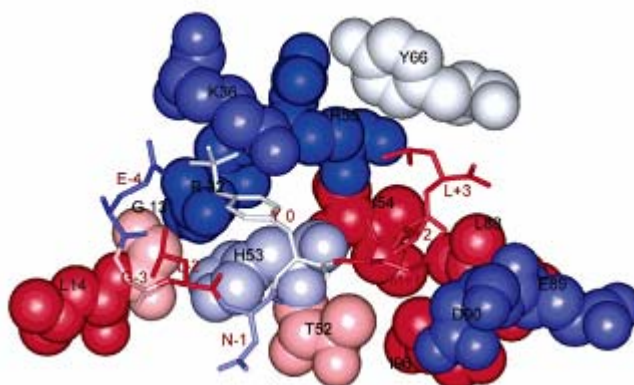


Abb. 11 SHP-1 N-SH2-Domäne im Komplex mit Ros pY2267 (EGLNpY²²⁶⁷ MVL) [177].

Die Aktivierung von SHP-1 erfordert eine effiziente Assoziation von Liganden an die N-SH2-Domäne und die Dissoziation der N-SH2-Domäne von der katalytischen PTP-Domäne. Der Dissoziation geht dabei eine Ligand-induzierte Konformationsänderung der N-SH2-Domäne voraus, die vom Bindungsmodus des Liganden (Abb. 12) und den Eigenschaften des pY+3 Restes innerhalb der Peptidsequenz abhängig ist. Unter Verwendung der verfügbaren Kristallstrukturen von SHP-2 konnten in Dockingexperimenten zwei verschiedene Bindungsmodi für die getesteten Peptide beschrieben werden. Klasse I-Peptide binden dabei die N-SH2-Domäne in einer gekrümmten Konformation, während die Klasse II Li-

ganden in einer gestreckten Konformation an die N-SH2-Domäne assoziieren (Abb. 12B-E).

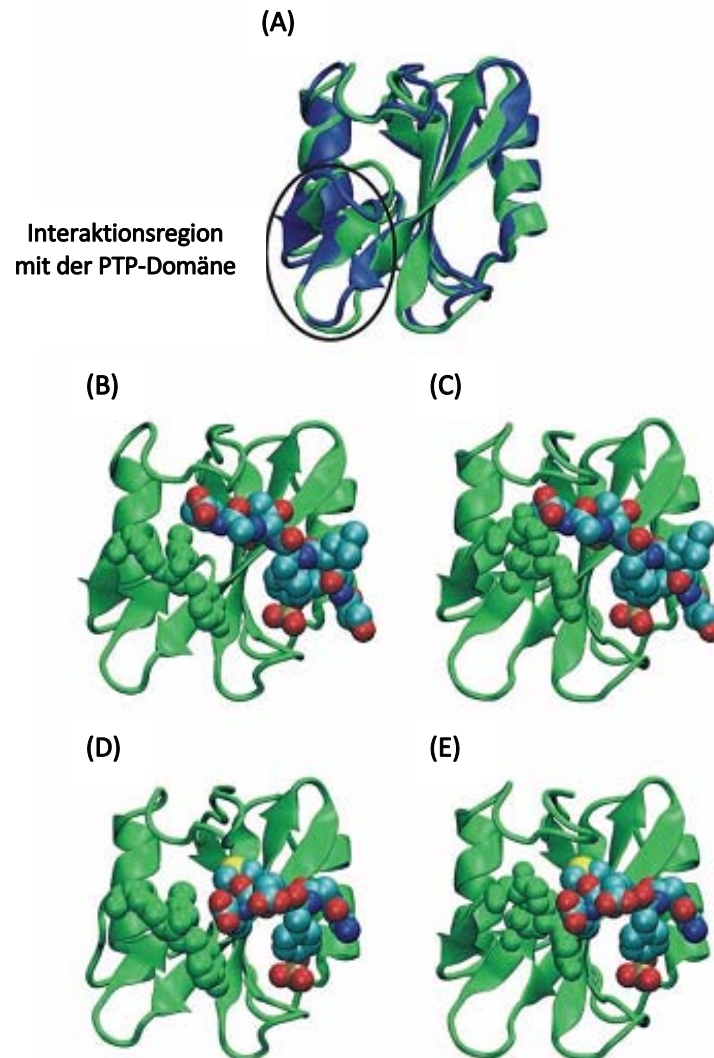


Abb. 12 (A) Superpositionierung der N-SH2-Domäne von SHP-2 in Peptid-gebundener Form (blau, PDB1AYA) und der freien Form (grün, PDB2SHP). Die freie Form entspricht der inaktiven Form der Phosphatase (PTP-N-SH2-Komplex).

(B) Peptidbindung im Klasse II-Bindungsmodus. N-SH2-Domäne ist im Peptid-gebundenen Zustand dargestellt.

(C) Einlagerung des Liganden (Klasse II) in die freie N-SH2-Domäne des inaktiven Enzyms.

(D) und (E) Darstellung des Klasse I-Bindungsmodus

Phosphopeptid und Schleifenregion der N-SH2-Domäne (Reste 65-68) in Van-der-Waals Darstellung, N-SH2-Domäne in Ribbon-Darstellung [46].

Die lineare Leitsequenz Ros pY²²⁶⁷ lässt sich der Klasse II-Liganden zuordnen. Deren gestreckte Bindungskonformation resultiert in einer Aktivierung der Proteintyrosinphosphatase (Abb. 11) [177]. Die Aktivierung von SHP-1 erfolgt nur, wenn die pY+3-Bindungstasche optimal ausgefüllt wird (Klasse II-Liganden). Im Fall der zyklischen Klasse II-Superaktivatoren führen die großen und sperrigen Aminosäureseitenketten in pY+3 zu einer optimalen Besetzung der Tasche. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Bindung der zyklischen Klasse I-Liganden der ersten Serie nicht zur Aktivierung der Phosphatase. Wahrscheinlich ist der Leucinrest in pY+3 zu kurz, um die für die Dissoziation des N-SH2-PTP-Komplexes notwendige Konformationsänderung auszulösen [46].

Neben den Bestrebungen konformationsstabilisierte N-SH2-Liganden mit inhibitorischen Eigenschaften zu generieren, sind in der Literatur auch andere Ansätze beschrieben worden. Eine Art dieser Liganden enthält, z.B. negativ geladene Phosphonate oder Carboxylate als Phosphotyrosin-Isostere, die sich nachteilig auf die Membranpermeabilität auswirken. Ein spezifischeres Verhalten verbunden mit einem verbesserten Penetrationsverhalten weisen die von PARK *et al.* beschriebenen Peptidylaldehyde auf. Sie stellen kovalente Effektoren von SHP-1 dar, die zur Blockierung der N-SH2-Domäne führen. Diese reversiblen „*slow binding*“-Effektoren aktivieren die Phosphatase bis 150 µM mit einer halbmaximalen Aktivität von ca. 60 µM. Erst in höheren Konzentrationsbereichen waren die Peptidylaldehyde in der Lage SHP-1 zu inhibieren. Die reduzierte Phosphataseaktivität resultiert dabei ausschließlich aus der Bindung des Peptidylaldehydes an das aktive Zentrum der PTP-Domäne. Es wird dabei angenommen, dass sich bei der Bindung dieser Art von indirekten N-SH2-Inhibitoren an die PTP-Domäne, ein anfänglich nicht-kovalenter Imin-Komplex ausbildet. Dieser Komplex wandelt sich dann mit dem im katalytischen Zentrum verankerten Argininrest langsam in ein kovalentes Enamin-Addukt um. Die anfängliche Aktivierung von SHP-1 im geringen Konzentrationsbereich resultiert dabei aus der gleichen Reaktion mit dem konservierten ArgβB5-Rest innerhalb der N-SH2-Domäne [178].

3 ZIELSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Entwicklung von Phosphotyrosinliganden der N-SH2-Domäne der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 zu leisten, die es erlauben, den Zustand der nativen Inhibierung von SHP-1 zu fixieren. Solche Inhibitoren helfen, den Aktivierungsmechanismus der Phosphatase genauer zu verstehen, und gleichzeitig stellen sie nützliche Werkzeuge zur Untersuchung entsprechender SHP-1 abhängiger Signalwege dar. Die Sequenzen der zu synthetisierenden Phosphopeptide basieren auf der beschriebenen Konsensussequenzklasse I für die N-SH2-Domäne und der Sequenz um den Phosphotyrosinrest pY²²⁶⁷ der epithelialen Rezeptortyrosinkinase Ros, die einen hochaffinen, natürlichen Interaktionspartner für SHP-1 darstellt.

Neben neuen monovalenten Liganden (Abb. 13A) für die N-SH2-Domäne (Motiv I) sollten auch erstmals bivalente Phosphopeptidliganden generiert werden (Abb. 13B), die sowohl an die N-SH2-Domäne als auch an die PTP-Domäne (Motiv II) assoziieren sollten.

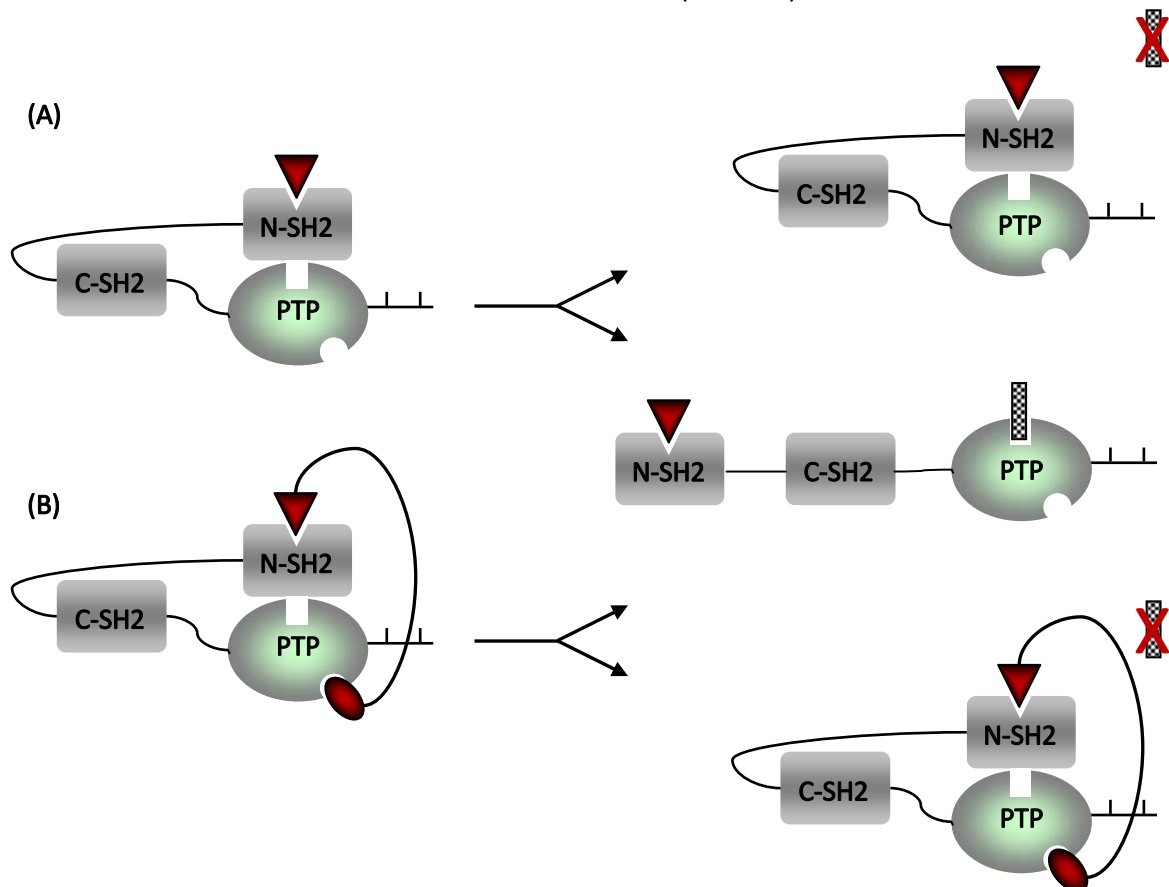


Abb. 13 Vorschläge für (A) monovalente und (B) bivalente Modulatoren der Enzymaktivität von SHP-1.
 ▼ = monovalenter Ligand (Motiv I), ▼● = bivalenter Ligand (Motiv I + II), ▨ = SHP-1 Substrat.

Zusätzlich zu den durch Zyklisierung konformationsstabilisierten bivalenten Liganden, sollten bivalente, lineare Peptide gewonnen werden. Anhand dieser Strukturen sollte überprüft werden, ob eine N-terminale Sequenzverkürzung um die für die Erkennung der N-SH2-Domäne wichtige Position pY-2 durch die in der Literatur beschriebene C-terminale Sequenzerweiterung kompensiert werden kann. Anhand ihrer biologischen Testung sollen Aussagen über deren Fähigkeit, die SHP-1 Aktivität zu stimulieren und deren Bindungsverhalten gegenüber der N-SH2-Domäne bzw. des N-SH2/PTP-Komplexes getroffen werden. Die Stimulation der Phosphataseaktivität durch die synthetisierten N-terminal freien Liganden sollte durch Umsetzung von p-NPP zu p-Nitrophenolat spektrophotometrisch bestimmt werden. Die Ermittlung der Bindungsaffinitäten der Phosphopeptidliganden über Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie sollte unter Verwendung von N-terminal biotinylierten Liganden erfolgen. Mit Hilfe von Dockingexperimenten sollte abschließend ein Bindungsmodus für die jeweiligen Liganden in Anlehnung an die experimentellen Befunde ermittelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte erstmals ein über N-Rückgrat-Seitenketten-Zyklisierung konformationell eingeschränkter Ligand $\text{EGLNc}\Psi[\text{CON}((\text{CH}_2)_3\text{NH})\text{pYNleE}(\text{NHCH}_2\text{CO})]\text{L-NH}_2$ generiert werden. Dieser Ligand resultierte aus Molecular Modelling Studien, die in Folge von Dockingexperimenten mit Peptiden vorangegangener Serien durchgeführt wurden. In einer Reihe von Publikationen ist die Darstellung von N-alkylierten Aminosäuren beschrieben, allerdings nicht die eines phosphorylierten N-funktionalisierten Bausteins, über den die Zyklisierung gewährleistet werden soll. Zunächst sollte für die Darstellung des Liganden die Einführung der Phosphatgruppe anhand einer Modellsequenz (LNYMVL-NH₂) durchgeführt werden. Begleitend dazu folgen Versuche zum Einbau eines phosphorylierten bzw. unphosphorylierten N-funktionalisierten Tyrosinbausteins in die Ros pY²²⁶⁷ abgeleitete Zielsequenz. Eine Kombination aus den Ergebnissen dieser Experimente sollte letztendlich zur Generierung des gewünschten N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden führen und Synthesewege zu N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Phosphopeptidliganden aufzeigen.

4 MATERIALIEN UND METHODEN

4.1 MATERIALIEN

4.1.1 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

Festphasenpeptidsynthese/Phosphorylierung

Die Lösungsmittel Diethylether, Dichlormethan und Tetrahydrofuran wurden nach den allgemein üblichen Methoden getrocknet und frisch destilliert eingesetzt. Die Verwendung von N,N-Dimethylformamid erfolgte nach Vortrocknung über Molsieb A4 und Destillation über Phthalsäureanhydrid. Bei der Festphasenpeptidsynthese wurden die nachfolgend aufgelisteten Substanzen genutzt:

Chemikalien	Firma
Acetanhydrid	Fluka
(+)Biotin	Fluka
(Boc) ₂ O	Fluka
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl)	Sigma-Aldrich
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid (<i>t</i> -BuOOH)	Sigma-Aldrich
m-Chlorperoxybenzoesäure (mCPBA)	Sigma-Aldrich
DCM	Mineralöle Albert
DIEA	Fluka
Diethylether	Mineralöle Albert
Di- <i>tert</i> -butyl-N,N-diethylphosphoramidit	Sigma-Aldrich
DMF	Mineralöle Albert
HBTU	IRIS Biotech
HCl	Roth
HOBt	IRIS Biotech
Morpholin	Fluka
N-Methylimidazol	Fluka
Natriumdisulfit (Na ₂ S ₂ O ₅)	Sigma-Aldrich
Pd ⁰ (PPh ₃) ₄	Lancaster
Piperidin	IRIS Biotech
PyBOP	Novabiochem
TBTU	Novabiochem
<i>tert</i> -Butanol	Fluka
1 <i>H</i> -Tetrazol	Sigma-Aldrich
TFA	VWR
TFFH	IRIS Biotech
TIPS	Fluka

Syntheseharz und Aminosäurederivate	Firma
Rink-Amid-MBHA-Harz	Novabiochem
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Val-OH	Orpegen
Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Tyr(PO ₃ H ₂)-OH, Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH	Novabiochem
Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Asp(OAll)-OH	Bachem
Fmoc-Ado-OH	NeoMPS

Peptidanalytik und -charakterisierung

HPLC	Firma
Acetonitril, Wasser	VWR
Massenspektrometrie	
α -Cyano-hydroxymizsäure	Fluka
Dünnschichtchromatographie	
Pyridin, Essigester, Eisessig	Fluka
Chloroform, Methanol, Wasser, n-Butanol	VWR
Aminosäureanalyse	
Fertigpuffer, Ninhydrin, Reagenzien, Aminosäurestandard	Laborservice Onken
Säulenchromatographie	
Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm)	Merck

Analyse der GST-Fusionsproteine

Chemikalien	Firma
SDS	AppliChem
Polyacrylamid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Roth
PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas

Konzentrationsbestimmungen

Chemikalien	Firma
Biomol Green Reagenz	Biomol
Phosphat Standard	Biomol
Roti® Nanoquant	Roth

Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Proteaseinhibitoren	Firma
Aprotinin, Pefabloc	Roth
Pepstatin	AppliChem
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Antibiotika	
Chloramphenicol	Roth
Ampicillin	AppliChem
weitere Chemikalien	
Dansyl-Glu-Gly-Arg-Chlormethylketon	Calbiochem
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
DNase I	AppliChem
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth
Faktor Xa	New England Biolabs
Glutathion Sepharose™ 4B	GE Healthcare
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	AppliChem
LB-Medium	AppliChem
Lysozym	Roth
Triton X-100	Roth

4.1.2 PUFFER**Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

<i>Lysepuffer (PBS), pH 7,3</i>	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM DTT
<i>+ Proteaseinhibitoren</i>	2 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepstatin 100 µg/ml Pefabloc 1 mM PMSF

<i>Elutionspuffer I, pH 8</i>	50 mM Tris 100 mM NaCl 10 mM DTT
<i>Elutionspuffer II, pH 8</i>	Elutionspuffer I 20 mM GSH
<i>Faktor Xa Puffer, pH 8</i>	50 mM Tris 100 mM NaCl 2 mM CaCl ₂
<u>Analyse der GST-Fusionsproteine</u>	
<i>Trenngelpuffer, pH 8,8</i>	2 M Tris-HCl
<i>Obergelpuffer, pH 6,8</i>	0,5 M Tris-HCl
<i>6 x Protein-Ladepuffer</i>	3 ml 20 % SDS 3 ml β-Mercaptoethanol 4 ml Glycerol
<i>Laufpuffer, (1 l)</i>	3,03 g Tris 15,4 g Glycin 5 ml 20 % SDS
<u>Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie</u>	
<i>Aktivitätstest-Puffer, pH 7,4</i>	100 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EDTA (pH 8) 10 mM DTT
<i>Biacore-Laufpuffer, pH 7,4</i>	10 mM Hepes 150 mM NaCl 3,4 mM EDTA (pH 8) 0,005 % Tween 20
<i>Regenerationspuffer, pH 7,4</i>	Biacore-Laufpuffer 0,1 % SDS
<i>Konditionierungslösung</i>	1 M NaCl in 50 mM NaOH

4.1.3 BAKTERIENSTÄMME

BL21(DE3)pLysS zur Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine (Stratagene)

4.1.4 PLASMIDE

Die Plasmide wurden von der AG Molekulare Zellbiologie (Zentrum für Molekulare Biomedizin, Jena) zur Verfügung gestellt.

pGEX-5X-1-SHP-1 E. coli Expressionsvektor zur Herstellung von GST-SHP-1
(epitheliale Form)

pGEX-5X-1-SH2-N E. coli Expressionsvektor zur Herstellung von GST-N-SH2 (SHP-1)
(Aminosäuren 1-104)

4.2. METHODEN

4.2.1 FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE

4.2.1.1 DARSTELLUNG DER LINEAREN PEPTIDE

Die manuelle Festphasensynthese der Peptide erfolgte nach der Fmoc-Strategie an einem polymeren Träger in Polypropylen-spritzen mit Fritten (Intavis). Als polymerer Träger diente Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Beladung von 0,64 mmol/g. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde durch eine 20%ige Piperidin/DMF-Lösung (1. 5 min, 2. 15 min) realisiert. Nach 20-minütigem Quellen des Harzes in DMF erfolgte die Zugabe einer Lösung aus der zu koppelnden Fmoc-Aminosäure (4 equiv.), HBTU bzw. TBTU (4 equiv.), HOBt (4 equiv.), sowie DIEA (8 equiv.) in DMF. Aus Kostengründen wurde bei der Kopplung des Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH-Bausteins mit 2-fachem Überschuss an Aminosäure und Kopplungsreagenzien gearbeitet. Die Base wurde in 6-fachem Überschuss zugegeben. Die Kopplungszeit betrug 1h. Die Kopplungsprozedur wurde zum Erreichen einer maximalen Kopplungseffizienz wiederholt. Überschüssige Reagenzien und Nebenprodukte wurden durch intensives Waschen mit DMF (5-7 x) und DCM (3 x) nach jedem Abspaltungs- und Kopplungsschritt entfernt. Die Menge des bei der Fmoc-Abspaltung entstandenen Dibenzofulven-Piperidin-Addukts wurde spektralphotometrisch bei 301 nm ermittelt. Die gemessene

Extinktion ist ein Maß für die Kopplungseffizienz und lässt die Berechnung der Kopplungsausbeute zu. Im Anschluss an die Kopplung der letzten Aminosäure erfolgte ein gründliches Waschen des Harzes mittels DMF und DCM sowie die Trocknung. Im Anschluss daran wurde das Harz aufgeteilt, um die Peptide in ihrer N-terminal freien bzw. biotinylierten Form zu erhalten.

I. N-terminal freie, lineare Liganden

Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde unter Verwendung von 20% Piperidin/DMF realisiert. Im Anschluss wurde das Harz gründlich gewaschen (5 x DMF, 3 x DCM) und getrocknet.

Ausbeuten: 45-76% (Rohprodukt)

II. N-terminal biotinylierte, lineare Liganden

Vor der Biotin-Modifizierung der Peptide wurde ein Linker durch die Kopplung von Fmoc-Ado an den freien N-Terminus der Sequenz eingebracht, anschließend erfolgte die Kopplung von Biotin. Bei der Kondensation von Fmoc-Ado (2 equiv.) wurde mit einem 2-fachen Überschuss an HBTU, HOBt und 4-fachen Überschuss an Base gearbeitet. Zur Biotinylierung wurden PyBOP (4 equiv.) und DIEA (8 equiv.) verwendet. Die Kopplungszeiten betrugen jeweils 2 x 1 h. Zur Abspaltung der Peptidsequenz vom Harz, sowie der Seitenketten-schutzgruppen (Trityl (Asn), *tert*-Butyl (Glu)) wurden TIPS (2,5%), Wasser (2,5%) und TFA (95%) direkt auf das getrocknete Harz gegeben. Der Ansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler belassen.

Im Anschluss wurde die Probe in kalten Diethylether filtriert und das Harz mehrfach mit 95% TFA/Wasser gewaschen. Das gefällte Peptid wurde abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit kalten Diethylether resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurde das Peptid aus 80%igem *tert*-Butanol lyophilisiert.

4.2.1.2 DARSTELLUNG DER ZYKLISCHEN PEPTIDE

Die Synthese der zyklischen Peptide wurde an Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Ausgangsbeladung von 0,54 mmol/g durchgeführt. Der Syntheseverlauf der linearen Peptidsequenzen erfolgte dabei analog wie im Kapitel 4.2.1.1 beschrieben. Zur Realisierung der Zyklisie-

ung wurden die orthogonal geschützten Aminosäurebausteine Fmoc-Asp(OAll)-OH und Fmoc-Lys(Alloc)-OH in die lineare Sequenz eingebaut. Der Einbau des monobenzylgeschützten Phosphotyrosinbausteins (Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH) in die wachsende Peptidkette erfolgte unter Verwendung eines 2-fachen Überschusses an Aminosäure mit HBTU (2 equiv.), HOBt (2 equiv.) und DIEA (6 equiv.). Zur Modifizierung des N-Terminus wurde das getrocknete Harz geteilt.

I. N-terminal freie, zyklische Liganden

Nach finaler Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe erfolgte der Einbau einer Boc-Schutzgruppe. Dazu wurde $(\text{Boc})_2\text{O}$ (5 equiv.) nach Aktivierung mit DIEA (10 equiv.) in DMF für 2 h inkubiert [176].

Ausbeuten: 36-41% (Rohprodukt)

II. N-terminal biotinylierte, zyklische Liganden

Die Biotinylierung des N-Terminus wurde analog der linearen Liganden, wie im Kapitel 4.2.1.1 beschrieben, durchgeführt.

Die Abspaltung der Allylester- und Alloc-Gruppen wurde unter Schutzgas (Argon) durchgeführt. Dabei wurde eine Abspalllösung aus DMF, THF, 0,5 N HCl, Morpholin (1:1:0,5:0,45) und einer Spatelspitze $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ verwendet [179]. Die Zyklisierung erfolgte unter Verwendung von PyBOP (6 equiv.) und DIEA (12 equiv.) für 3 h [176]. Die Abspaltung des Peptides vom Harz, sowie der Seitenkettenschutzgruppen wurde wie unter 4.2.1.1 beschrieben durchgeführt, wobei die Abspaltungszeit 5-6 h betrug [66].

4.2.1.3 DARSTELLUNG DES RÜCKGRAT-SEITENKETTEN-ZYKLISCHEN PEPTIDES

I. Peptidsynthese

Die Synthese des Peptides erfolgte analog der unter 4.2.1.2 beschriebenen Methode, wobei ausgewählte Kopplungsschritte unter Verwendung von TFFH (2eq.), Fmoc-Aminosäure (2 eq.) und DIEA (4 eq.), mit einer Voraktivierungszeit von 12 min durchgeführt wurden. Notwendige Capping-Schritte erfolgten durch den Einsatz von Acetanhydrid:N-Methylimidazol:DMF (1:2:3) für 30 min. Die finale Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger erfolgte wie unter 4.2.1.1 beschrieben.

II. Peptidphosphorylierung in Lösung

Das zu phosphorylierende Peptid (46 mg, 0,06 mmol) und das Phosphorylierungsreagenz Di-*tert*-butyl-N,N-diethylphosphoramidit (20 μ l, 0,07 mmol) wurden in 1 ml THF gelöst und 1*H*-Tetrazol (15,1 mg, 0,216 mmol) hinzugegeben. Nach 15 min (20 °C) wurde die Lösung auf -40 °C abgekühlt. Anschließend wurde eine Mischung aus *m*-Chlorperoxybenzoesäure* (18,1 mg, 0,11 mmol) und DCM (150 μ l) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 20 °C gerührt. Danach wurden 10% Na₂S₂O₅ (602 μ l) und Diethylether (3 ml) hinzugegeben. Die Lösung wurde in Diethylether aufgenommen und je 2 x mit 10% NaHCO₃ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer vollständig eingeeengt.

*Anstelle von *m*-Chlorperoxybenzoesäure wurde in ausgewählten Experimenten eine Mischung aus *tert*-Butylhydroperoxid (25 μ l, 3 M in Toluol) in DCM verwendet. Die Umwandlung von oxidierten Methionen erfolgte wie in der Literatur beschrieben [180].

III. Peptidphosphorylierung an der festen Phase

Die Phosphorylierung an der festen Phase erfolgte unter Verwendung von 50 mg harzgebundenem Peptid, 1*H*-Tetrazol (32,5 mg, 0,46 mmol) und Di-*tert*-butyl-N,N-diethylphosphoramidit (43 μ l, 0,15 mmol) in 2 ml DCM. Die Inkubation (30 min) erfolgte in einem Filterreaktionsgefäß bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung entfernt und *m*-Chlorperoxybenzoesäure* (39,7 mg, 0,23 mmol) gelöst in 1 ml DCM hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min (Raumtemperatur) wurde das Harz 3 x 2 min mit DCM gewaschen und anschließend lyophilisiert.

*Anstelle von *m*-Chlorperoxybenzoesäure wurde in ausgewählten Experimenten eine Mischung aus *tert*-Butylhydroperoxid (53 μ l, 3 M in Toluol) in DCM verwendet. Die Umwandlung von oxidierten Methionen erfolgte wie in der Literatur beschrieben [180].

IV. Fmoc-N[(CH₂)₃NHAlloc]Tyr-OH

Die Generierung von NH[(CH₂)₃NHAlloc]Tyr-OH sowie die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte wie in der Literatur beschrieben [181, 182].

V. Fmoc-N[(CH₂)₃NHAlloc]Tyr(PO₃Bu^t₂)-OH

Zu einer Lösung aus Fmoc-N[(CH₂)₃NHAlloc]Tyr-OH (0,5 g, 0,92 mmol) und trockenem THF wurden DIEA (0,16 ml, 0,92 mmol) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (0,17 g, 1,10 mmol) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu diesem Ansatz wurden 1*H*-Tetrazol (0,19 g, 2,76 mmol) und Di-*tert*-butyl-N,N-diethylphosphoramidit (0,28 g, 1,10 mmol) in trockenem THF hinzugegeben und für weitere 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde *tert*-Butylhydroperoxid (0,50 ml, 3 M in Toluol) zugesetzt. Nach 20 min wurden die Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 150 ml Ethylacetat aufgenommen und je 3 x mit 5% KHSO₄ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer vollständig eingengt. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule mit Chloroform/Methanol aufgereinigt.

4.2.2 AUFREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER PEPTIDE

4.2.2.1 SEMIPRÄPARATIVE HPLC

Die Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte an einer LC 8A-Anlage der Firma SHIMADZU. Diese Anlage ist ausgestattet mit einer Eurospher 100-Säule der Firma KNAUER (C18, 250 x 32 mm, 5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße). Unter folgenden Bedingungen wurde die Trennung durchgeführt.

Eluent A:	0,1% TFA in Wasser
Eluent B:	0,1% TFA in 90% Acetonitril/Wasser
Flussrate:	10 ml/min
Detektion:	220 nm
Gradient :	15-65% Eluent B/120' für die Darstellung des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Peptides. Für alle anderen Peptide: siehe Tabelle 3

Tabelle 3: Gradienten der semipräparativen Trennung.

Peptid	Freie Form	Biotinylierte Form
2	20-70% Eluent B/120`	25-75% Eluent B/120`
3	30-80% Eluent B/120`	*
4	15-65% Eluent B/120`	*
5	20-70% Eluent B/120`	*
6	20-70% Eluent B/120`	*
7	25-75% Eluent B/120`	25-75% Eluent B/120`
8	25-75% Eluent B/120`	25-75% Eluent B/120`
9	25-75% Eluent B/120`	*
10	30-80% Eluent B/120`	30-80% Eluent B/120`

* Peptide wurden aufgrund geringer Ausbeuten / Bedarf analytisch getrennt;
 Eluent A: 0,1% TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% TFA in 90% Acetonitril; (10-50% Eluent B/40`).

4.2.2.2 ANALYTISCHE HPLC

Die Analyse der Peptide bzw. Aufreinigung (Tab. 3) mittels HPLC erfolgte an einer LC 10AT-Anlage der Firma SHIMADZU, die mit einer Vydac 218TP-Säule (25 x 4,6 mm, 300 Å Porengröße, 5 µm Korngröße) ausgestattet war. Zur Charakterisierung der Proben wurden folgende Bedingungen gewählt:

Eluent A: 0,1% TFA in Wasser

Eluent B: 0,1% TFA in Acetonitril

Flussrate: 1 ml/min

Detektion: 220 nm

Gradient : 10-50% Eluent B/40`, * 20-80% EluentB/60`, ** 10-60% EluentB/50`

* verwendete Methode zur Analyse der synthetisierten Blöcke Fmoc-N[(CH₂)₃NHAlloc]Tyr-OH und Fmoc-N[(CH₂)₃NHAlloc]Tyr(PO₃Bu^t₂)-OH

** verwendete Methode zur Analyse der unter 4.2.1.3 synthetisierten Peptide

4.2.2.3 MASSENSPEKTROMETRIE

Die Analyse erfolgte an einem Laser-Tec Research Massenspektrometer der Firma Perseptive Biosystems als Flugzeitspektren (MALDI-TOF). Als Matrix wurde α -Cyano-hydroxyzimtsäure und als Lösungsmittel 0,1% TFA in Acetonitril/Wasser (1:1) verwendet.

4.2.2.4 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Für diese Analysen wurden DC-HPTLC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0,25 mm, Merck; System 1, 3) sowie DC-RP-HPTLC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0,25 mm, Merck; System 2) genutzt.

Folgende Lösungsmittelsysteme wurden verwendet:

System 1: Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser (5:5:1:3)

System 2: Acetonitril/Wasser (1:1)

System 3: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)

System 4: Chloroform/Methanol (9:1)

System 5: n-Butanol/Eisessig/Wasser (48:18:24)

4.2.2.5 AMINOSÄUREANALYSE

Die Aminosäureanalyse der Peptide erfolgte mittels Aminosäureanalysator LC 3000 (Eppendorf-Biotronik). Die lyophilisierte Probe (50 μ l) wurde dazu mit 6 N HCl (1 ml) versetzt und bei 110°C für 24 Stunden hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäure an einem SpeedVac System (Savant) entfernt. Die Probe wurde nachfolgend mit Wasser (2 x je 1 ml) gewaschen und in 500 μ l Acetatpuffer aufgenommen.

Die Detektion erfolgte nach Derivatisierung mit Ninhydrin bei 570 nm und 440 nm. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren wurden anhand der integrierten Peakflächen verglichen mit denen eines Aminosäurestandards bestimmt.

4.2.3 EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DER GST-N-SH2-DOMÄNE IN *E. COLI*

Die Transformation des *E. coli* Stammes BL21(DE3)pLysS und die Expression der N-SH2-Domäne von SHP-1 als rekombinantes GST-Fusionsprotein erfolgten im Rahmen der Pro-

motionsarbeit von Dr. Kornelia Hampel / AG Imhof. Die bei -80°C gelagerten Bakterienpellets standen zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

4.2.3.1 BAKTERIENLYSE

10 g Bakterienpellet wurden in 100 ml Lysepuffer (+ Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zunächst mit DNase I (0,1 mg/ml) und 100 mM MgSO₄ für 20 min und anschließend mit 5 mM EGTA und EDTA für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine optimale Zellyse der Bakterienkultur zu erreichen wurde die auf Eis gelagerte Probe dreimal für 5 s sonifiziert (70% Power, Digital Sonifier W-250 D, Branson). Die unlöslichen Bestandteile wurden für 40 min bei 4°C und 20.000 rpm abzentrifugiert.

4.2.3.2 PROTEINREINIGUNG MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE UND GELFILTRATION

Die affinitätschromatographische Aufreinigung der GST-N-SH2-Domäne erfolgte unter Verwendung des Äkta Prime Systems (GE Healthcare), ausgestattet mit einer GStrap™ FF-Säule (5 ml). Die Probe wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die mit Lysepuffer equilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml Lysepuffer (2,5 ml/min) gespült und mit 50 ml Elutionspuffer I (2,5 ml/min) neu equilibriert. Die Elution des Proteins erfolgte mittels Elutionspuffer II (1 ml/min). Die proteinreichen Fraktionen (siehe Kapitel 4.2.6.2) wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 4.2.5) analysiert und für die folgende Gelfiltration vereinigt. Die Gelfiltration wurde mit Hilfe einer Sephacryl™ 16/60 S-100 High Resolution Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Als Eluent diente Biacore-Laufpuffer. Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 4.2.5) und mit Amicon® Ultra-15 Zentrifugalfiltern (Millipore) aufkonzentriert (4000 x g, 30 min).

4.2.4 EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON *FULL LENGTH* SHP-1 IN *E. COLI*

Der mit dem bakteriellen Expressionsplasmid pGEX-5X-1-SHP-1 transformierte *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS lag als Dauerkultur in der AG Imhof vor.

4.2.4.1 EXPRESSION DES GST-SHP-1-FUSIONSPROTEIN

5 ml mit Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml) versetztes LB-Medium wurden mit transformierten Zellen beimpft. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Vorkultur in 500 ml mit Antibiotika versetztes LB-Medium überführt. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,7. Durch Zugabe von IPTG (250 µM) wurde die Expression des GST-Fusionsproteins induziert. Nach 4-stündigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 4°C zentrifugiert (6000 rpm) und über Nacht bei 80°C gelagert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 10 ml Lysepuffer (+ Proteaseinhibitoren). Eine erfolgreiche Lyse der Zellen konnte durch Zugabe von Lysozym (0,5 mg/ml, 20 min bei Raumtemperatur) und einer anschließenden Inkubation mit Triton X-100 (0,5% v/v, 20 min bei Raumtemperatur) realisiert werden. Eine Klärung der viskosen Probe erfolgte durch Zusetzen von DNase I (0,1 mg/ml) und 100 mM $MgSO_4$. Nach Zugabe der Komplexbildner EDTA (5 mM) und EGTA (5 mM) wurden die löslichen Zellkomponenten der Probe von den unlöslichen mittels Ultrazentrifugation (30000 rpm, 30 min 4°C) getrennt.

4.2.4.2 AUFREINIGUNG DES GST-SHP-1-FUSIONSPROTEINS

Die Aufreinigung des Proteins wurde unter Verwendung von Gluthation Sepharose™ 4B bei 4°C durchgeführt. Die Bindung von GST-SHP-1 erfolgte nach Zugabe von 1 ml Gluthation Sepharose™ 4B durch einstündige Inkubation (4°C) auf dem Drehrad. Anschließend wurde die Lösung über eine Poly-Prep-Säule (Bio-Rad) gegeben. Nach dem Durchlauf der Probe wurden die Matrix und die gebundenen Proteine mit Lysepuffer (30 ml) und Elutionspuffer I (30 ml) gewaschen. Nach Zugabe von Elutionspuffer II (10 ml) wurde das Eluat fraktioniert (1 ml). Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Fraktionen wurde der optische Test nach Bradford angewandt (siehe Kapitel 4.2.6.2). Proteinreiche Fraktionen wurden mit Glycerol (30% v/v) versetzt und bei -80°C gelagert. Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Färbung überprüft (siehe Kapitel 4.2.5).

4.2.4.3 SPALTUNG DES GST-TAGS

Die Proteinlösung wurde unter zweifachem Pufferwechsel (je 1 h) gegen Faktor Xa Puffer dialysiert. Die Zugabe der Serinprotease Faktor Xa erfolgte im Verhältnis 1:200. Anschließend wurde die Probe für 16 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Proteaseinhibitoren Pefabloc (100 µg/ml) und Dansyl-Glu-Gly-Arg-Chlormethylketon (0,2 µM) führten zur Hemmung der Reaktion. Die Probe wurde unter Verwendung von Glutathion Sepharose™ 4B aufgereinigt. Das GST-freie Zielprotein wurde mit Glycerol (30% v/v) versetzt und bei -80°C gelagert. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft (siehe Kapitel 4.2.5, 4.2.6.2).

4.2.5 ANALYSE DER GST-FUSIONSPROTEINE MITTEL SDS-PAGE NACH LÄMMLI

Zur Charakterisierung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt [183]. Die Komponenten der Gellösungen wurden vereinigt (Tab. 4) und in eine Minigelkammer gegossen (mini VE Vertical Electrophoresis System, Amersham Bioscience). Dazu wurde 1 ml von dem Trenngelansatz entnommen und als Dichtungsgel in die Apparatur gegeben. Anschließend wurde das Trenngel eingefüllt. Zum Erhalt einer gleichmäßigen Oberfläche wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und die Sammelgellösung aufgefüllt. Vor dem Auftragen des Proteinextraktes auf das Sammelgel wurden die Proben in Protein-Ladepuffer verdünnt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Zur Abschätzung der Molekulargewichte diente ein definierter Proteinstandard. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanten Bedingungen (20 mA) in Laufpuffer.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Trenngel	7,5%	10%	Sammelgel	4%
30% Polyacrylamid	2,5 ml	3,3 ml	30% Polyacrylamid	0,66 ml
Trenngelpuffer	1,9 ml	1,9 ml	Obergelpuffer	1,25 ml
20% SDS	50 µl	50 µl	20% SDS	25 µl
Wasser	5,6 ml	4,8 ml	Wasser	3,1 ml
20% APS	40 µl	40 µl	20% APS	30 µl
TEMED	4 µl	4 µl	TEMED	2 µl

Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Entfernung des nicht an Proteine gebundenen Farbstoffes durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung. Die Trocknung der Gele erfolgte auf Filterpapier im Vakuum bei ca. 60°C für 2 h.

4.2.6 KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN

4.2.6.1 MALACHITGRÜNASSAY

Das bei der Hydrolyse der Phosphotyrosin-haltigen Peptide freigesetzte Phosphat kann unter Verwendung von Malachitgrün detektiert werden [184]. Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe (1:1) des Phosphat-Standards erstellt (1600 pmol → 200 pmol). Die hydrolysierten Peptidproben wurden entsprechend ihrer ermittelten Aminosäurekonzentration (siehe Kapitel 4.2.2.5) mit bidestilliertem Wasser verdünnt (> 2 mM → 1:10; < 2 mM → 1:5). Anschließend wurden 25 µl der verdünnten Peptidlösungen sowie der Standardlösungen mit 100 µl Malachitgrün-Reagenz (Biomol-Green) versetzt. Nach 25 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 620 nm gemessen und die Konzentration an freiem Phosphat anhand der Eichkurve bestimmt.

4.2.6.2 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Proteinbestimmung nach Bradford [185] erfolgte unter Verwendung der Roti-Nanoquant-Lösung nach Gebrauchsanweisung.

4.2.7 BIOLOGISCHE TESTUNG

4.2.7.1 PHOSPHATASE-AKTIVITÄTSTEST

Das Vermögen der linearen und zyklischen Liganden die Proteintyrosinphosphatase SHP-1 (*full length*) zu aktivieren, wurde unter Verwendung von pNPP als Phosphatase-Substrat bestimmt. Dazu wurden verschiedene Peptidkonzentrationen (500, 200, 100, 50, 25 µM) im Testansatz (Verdünnung mit Aktivitätstest-Puffer) hergestellt. Die verdünnten Peptidlösungen (40 µl) wurden in 96-Well-Platten vorgelegt und mit 5 µl 100 mM pNPP und 5 µl SHP-1 (80 µg/ml) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit

100 µl 1 M NaOH abgestoppt und bei 405 nm vermessen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte relativ zu Ros pY²²⁶⁷ (Extinktion bei 500 µM = 1).

4.2.7.2 OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZSPEKTROSKOPIE

Die Bindungsaffinitäten der Liganden gegenüber der N-SH2-Domäne von SHP-1 wurden mit der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) bestimmt. Die Untersuchungen wurden an einem mit Streptavidin beschichteten Sensorchip (SA-Chip, GE-Healthcare) über Oberflächenplasmonresonanz (Biacore 2000 Gerät; GE Healthcare, Biacore) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Konditionierung der Chipoberfläche erfolgte durch einen dreimaligen Waschvorgang mit der Konditionierungslösung (10 µl, 30 µl/min). Die Immobilisierung der biotinylierten Peptide erfolgte durch Injektion von 0,1 µM Peptidlösungen (2-5 µl, 10 ml/min) bis zu einem Level von 50-75 RU. Dabei erfolgte die Beladung beginnend mit Flusszelle 4. Die Flusszelle 1 auf jedem Sensorchip diente als Referenzzelle und wurde nicht mit Peptid beladen. Die Chipoberfläche wurde anschließend mit Biacore-Laufpuffer (30 µl/min) gewaschen. Für die Messung wurden steigende Konzentrationen an GST-N-SH2-Domäne (3,41 - 1000 µM) über den immobilisierten SA-Chip geleitet (30 µl, 15 µl/min). Nachfolgend wurde Biacore-Laufpuffer injiziert, um die Dissoziation (20 s) des Komplexes zu erreichen. Um den Chip zu regenerieren, wurde anschließend mit Regenerationslösung (10 s, 100 µl/min) gespült. Nach jedem Regenerationsschritt erfolgte die Equilibrierung des Chips mit Biacore-Laufpuffer (30 µl/min). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der BIAevaluation 2.0 Software. Die Dissoziationskonstanten wurden unter Verwendung der *steady state* Analyse ($RU_{eq} = RU_{max} * [GST-N-SH2] / (K_D + [GST-N-SH2])$) ermittelt.

4.2.8 DOCKINGSTUDIEN

Molecular Modeling Studien aller Peptid-N-SH2-Komplexe basieren auf der den Bindungsmodus II darstellenden Kristallstruktur PDB1AYA (im Komplex mit VLpYTAV) und auf der Kristallstruktur PDB1AYC im Komplex mit GGpYMAMG (Bindungsmodus I) [30, 169]. Dabei handelt es sich um die Kristallstrukturen der N-SH2-Domäne von SHP-2. Ein Sequenzvergleich der N-SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 zeigte, dass sich beide Proteine

nur außerhalb der Region der Peptidbindung unterscheiden. Es wird angenommen, dass die Peptidbindungsfurche der N-SH2-Domäne von SHP-2 als Modell für die Bindungstasche der N-SH2-Domäne von SHP-1 dienen kann. Alle Substitutionen und Additionen C-terminal des gebundenen Peptides basieren auf den experimentellen Koordinaten des Peptidrückgrates des komplexierten Peptides und wurden unter Verwendung des SPDBV Molecular Modeling Programms durchgeführt [206]. Die Energieminimierung der Peptid-N-SH2-Komplexe erfolgte unter Nutzung des Programms Amber [207].

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 AUSWAHL DER PHOSPHOPEPTIDLIGANDEN

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den monovalenten Phosphopeptidliganden erstmals auch bivalente Liganden für die N-SH2-Domäne von SHP-1 dargestellt. Wobei mit dieser Art von Liganden eine Bindung an zwei Proteindomänen beabsichtigt wurde.

Die Strukturen der Phosphotyrosin-haltigen Liganden basieren auf der Konsensussequenzklasse I und der Sequenz der epithelialen Rezeptortyrosinkinase Ros (Ros pY²²⁶⁷, (1)). Ros pY²²⁶⁷ stellt einen natürlichen und hochaffinen Interaktionspartner der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 dar (Abb. 15) [122].

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungseigenschaften von SHP-1 N-SH2-Liganden durch die Aminosäurereste in den Positionen pY-2, pY+1 und pY+3 bestimmt werden [143-145]. Dabei spielen die Bindungskonformation der Liganden und die Einpassung des Restes in pY+3 in die hydrophobe Bindungstasche der N-SH2-Domäne eine entscheidende Rolle hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus von SHP-1 [46, 176]. Die Leitstruktur Ros pY²²⁶⁷ zählt zu den Klasse II-Liganden, die in einer gestreckten Konformation an die N-SH2-Domäne binden und zu einer Aktivierung von SHP-1 führen (Abb. 12). Im Unterschied dazu zeigten zyklische Liganden (EGLc[K(COCH₂NH)pYMX]L-NH₂, X = Glu oder Asp), trotz ihrer beachtlichen Affinität zur N-SH2-Domäne ein reduziertes Potenzial in der Stimulation der Phosphataseaktivität [46]. Die Assoziation des zyklischen Liganden an die N-SH2-Domäne findet im Bindungsmodus Klasse I statt (Abb. 12). Die reduzierte Aktivierung der Enzymaktivität beruht dabei auf der unzureichenden Besetzung der Bindungstasche für den pY+3-Rest.

Zusätzlich zu der minimalen Erkennungssequenz leisten die Aminosäuren in pY+4 und pY+5 einen beachtlichen Beitrag zur Spezifität der N-SH2-Domäne von SHP-1. Die Bindung von Liganden an N-SH2 wird dabei durch hydrophobe (Trp, Tyr, Phe, Leu, Ile) und positiv geladene Reste (His, Arg, Lys) in diesen Positionen im hohen Maße gesteigert. Im Gegensatz dazu wird in pY+6 eine große Vielzahl von Aminosäuren akzeptiert, was auf eine geringere Spezifität der N-SH2-Domäne gegenüber dieser Position schließen lässt [168]. Dieser Aminosäurerest ist gegenüber denen in pY+4 und pY+5 bereits mehr der Umgebung ausgesetzt und unterhält demnach keine intensiven Kontakte mit der SH2-Domäne. In

Modellierungsstudien konnte eine Anhäufung von basischen Aminosäuren auf der Oberfläche der PTP-Domäne identifiziert werden (Abb. 14). Dieser Bereich stellt die Kontaktfläche für saure Aminosäuren (Motiv II) innerhalb der Ligandsequenz dar. Unter Berücksichtigung dieser vorangestellten Informationen wurden Phosphotyrosin-haltige Liganden synthetisiert, die hinsichtlich ihrer Fähigkeit die Phosphataseaktivität zu modulieren, untersucht wurden (Abb. 15).

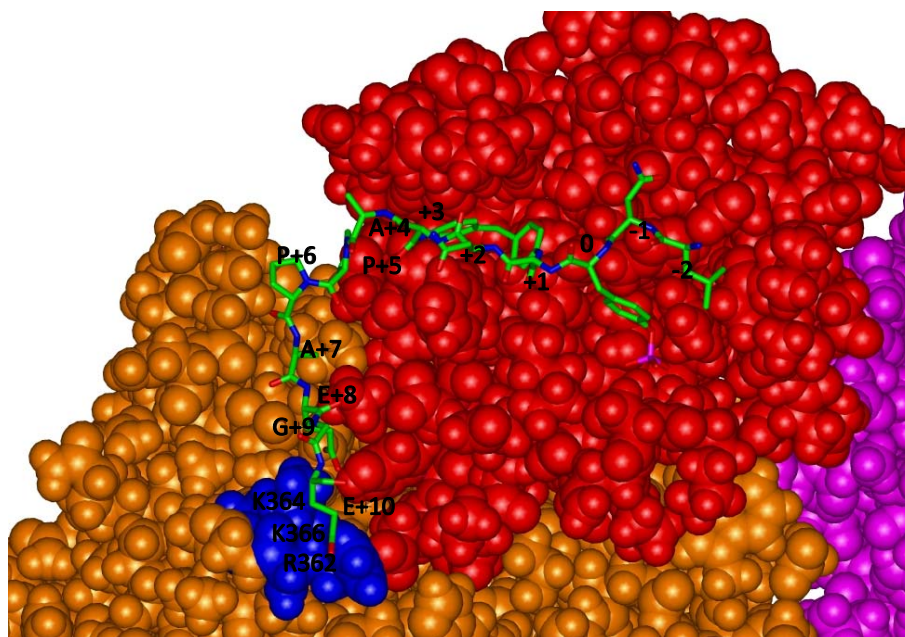


Abb. 14 Docking eines bivalenten Liganden an SHP-1 (Spacefill-Darstellung)
N-SH2-Domäne (rot), PTP-Domäne (orange), Cluster basischer Aminosäuren (K^{364} , K^{366} , R^{362} ; blau), bivalenten Ligand in Stick-Darstellung (blau, grün).

Die Aminosäurereste pY-4 bis pY+3 des linearen Phosphopeptidliganden (**4**) sind beispielsweise aus der Leitstruktur Ros pY²²⁶⁷ (**1**) und den Grundkenntnissen aus Vorarbeiten abgeleitet [46, 177]. Weiterhin wurden die dazu analogen, N-terminal verkürzten Peptide (**5**), (**6**) synthetisiert, um zu überprüfen inwiefern die C-terminale Verlängerung der Erkennungssequenz um die Positionen pY+4 und pY+5 eine N-terminale Verkürzung hinsichtlich der Bindungsaffinität kompensiert. Vor allem mit Hilfe der Verbindung (**6**) sollte ermittelt werden, ob eine „Restbindung“ bestehen bleibt, obwohl eine Determinante der Erkennung, die Position pY-2, fehlt. Das Sequenzmotiv Nle-Phe-Pro in den Positionen pY+4 bis pY+6 repräsentiert ein hochaffines Bindemotiv für die SHP-1 N-SH2-Domäne

(Abb. 15) [168]. Dieses Motiv bzw. eine modifizierte Form wurde in die Peptide (2) bis (10) eingebaut. Die Modifizierung beruht auf der Ausbildung von Zyklen zwischen den Positionen pY+2 und pY+4/+6, pY-1 und pY+2 bzw. pY+1 und pY+3, die zwischen den Aminosäuren Lys und Asp ausgebildet wurden (Tab. 5). Mit der Modifizierung durch konformationelle Einschränkung (Zyklisierung) sollte eine Erhöhung der Bindungsaffinität im Vergleich zu Ros pY²²⁶⁷ (1) erzielt werden. Der Einbau der Sequenz Pro-Ala-Pro-Glu-Glu-Glu in die Positionen pY+6 bis pY+11 ((4) bis (10)) sollte die Bindung mit der auf der PTP-Domäne identifizierten basischen Kontaktfläche realisieren (Abb. 14 und 15). Die bivalenten Liganden (9) und (10) stellen eine C-terminale Verlängerung der Peptide (2) und (3) dar. Zusätzlich zu diesen Peptiden wurden weitere zyklische Peptide ((7) und (8)) generiert, die sich in den am Ringschluss beteiligten Aminosäuren unterscheiden (Tab. 5). Im Unterschied zu den von HAMPEL *et al.* getesteten zyklischen Effektoren, die über die Positionen pY-1 und pY+2 zyklisiert wurden, weisen die zyklischen Liganden dieser Arbeit Änderungen in der Ringposition und in der Ringgröße (14 bis 20 Ringatome) auf (Tab. 5) [46].

Tabelle 5: Synthetisierte Phosphopeptidliganden (1) bis (10).

Peptid	Sequenz	Ringatome	Ringposition
1	EGLNpY ²²⁶⁷ MVL-NH ₂ (Ros pY ²²⁶⁷)	-	-
2	EGLNpYMc[KLD]FP-NH ₂	14	+2 → +4
3	EGLNpYMc[KLN/eFD]-NH ₂	20	+2 → +6
4	EGLNpY ²²⁶⁷ MVLN/eFPAPEEE-NH ₂	-	-
5	__LNpY ²²⁶⁷ MVLN/eFPAPEEE-NH ₂	-	-
6	____pY ²²⁶⁷ MVLN/eFPAPEEE-NH ₂	-	-
7	EGLc[KpYMD]LN/eFPAPEEE-NH ₂	17	-1 → +2
8	EGLNpYc[KVD]N/eFPAPEEE-NH ₂	14	+1 → +3
9	EGLNpYMc[KLD]FPAPEEE-NH ₂	14	+2 → +4
10	EGLNpYMc[KLN/eFD]APEEE-NH ₂	20	+2 → +6

Dabei handelt es sich um Zyklen, die sich um die für die Erkennung wichtigen Positionen (pY+1 und pY+3) positionieren bzw. diese Positionen integrieren. Darüber sollte u.a. festgestellt werden, ob ein direktes (8) bzw. indirektes ((2), (3), (7), (9) und (10)) Involvieren

dieser Seitenketten in den Zyklus Einfluss auf die Assoziation an die N-SH2-Domäne hat und welcher Art dieser Einfluss ist.

Die Kombination der inhibitorischen Eigenschaften zyklischer Liganden mit einem hochaffinen Erkennungsmotiv in den Positionen C-terminal von pY+3 resultierte in der Darstellung der Liganden **(2)** und **(3)**. Die Zyklisierung erfolgte dabei zwischen den Positionen pY+2 und pY+4 **(2)** bzw. pY+2 und pY+6 **(3)**, um die für die Bindung wichtigen Erkennungsdeterminanten in pY+1 und pY+3 nicht zu beeinträchtigen.

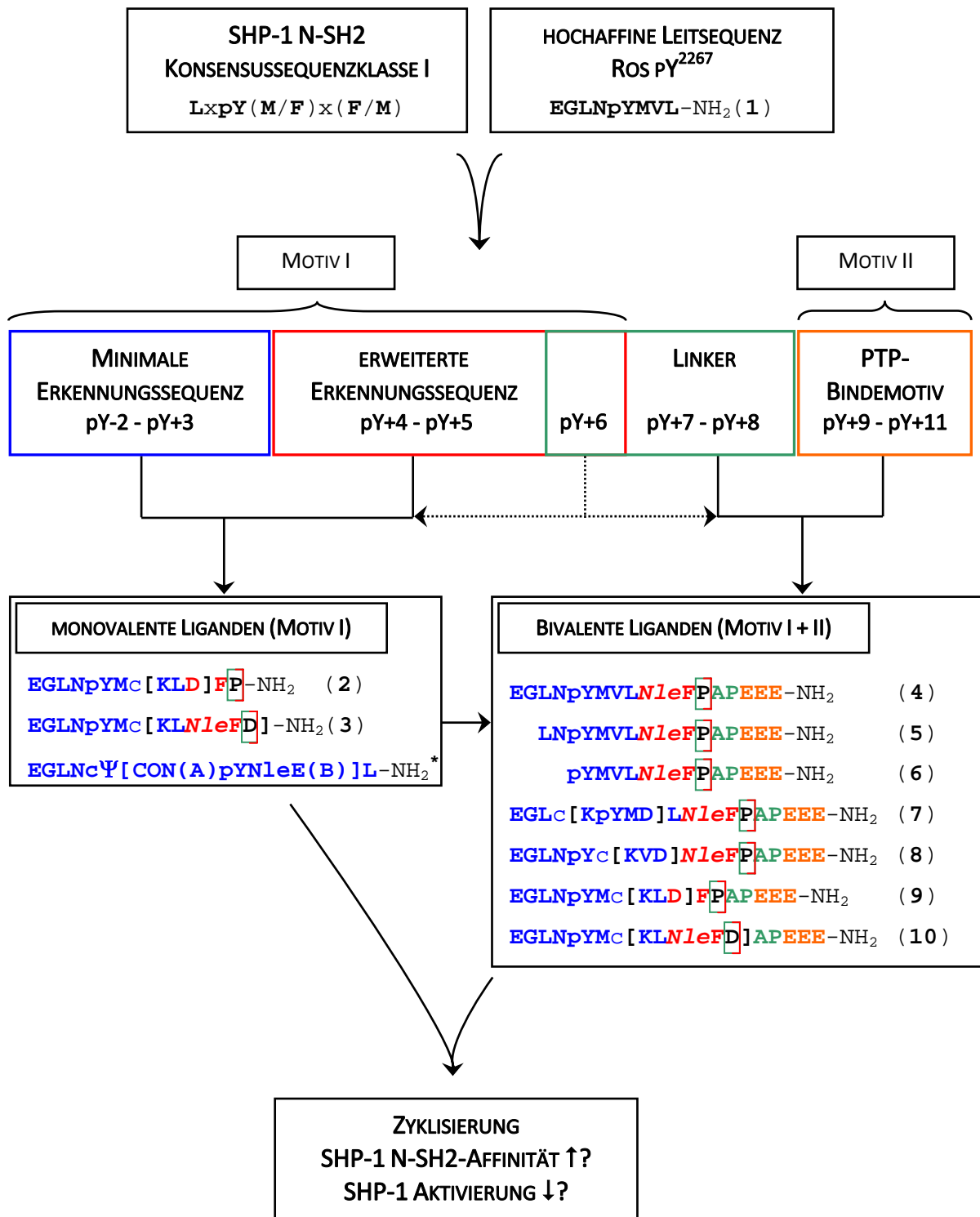


Abb. 15 Strukturherleitung der mono- bzw. bivalenten Liganden für SHP-1.

A = $((CH_2)_3NH)$, B = $(NHCH_2CO)$

* Darstellung des Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Peptides s. Kapitel 5.5

5.2 DARSTELLUNG DER PHOSPHOPEPTIDLIGANDEN

Für die Synthese von Peptiden, deren Sequenzen Phosphotyrosin enthalten existieren zwei Hauptstrategien [186, 187].

(i) Die postsynthetische Phosphorylierung der freien Hydroxylgruppe unter Verwendung von Phosphorylierungsreagenzien, wie Phosphorchloridite, Phosphorchloridate und Phosphoramidite und

(ii) der Einbau von geschützten bzw. ungeschützten Phosphotyrosinbausteinen "*building blocks*", wie Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH oder Fmoc-Tyr($\text{PO}(\text{OBzl})\text{OH}$)-OH (Abb. 16).

Die postsynthetische Phosphorylierung ist für Met/Trp-haltige Sequenzen limitiert, da der methodisch bedingte Oxidationsschritt zu Nebenreaktionen führt. Weiterhin können sterische Einschränkungen infolge der Ausbildung von Sekundärstrukturen diese Art der postsynthetischen Modifikation beschränken [188].

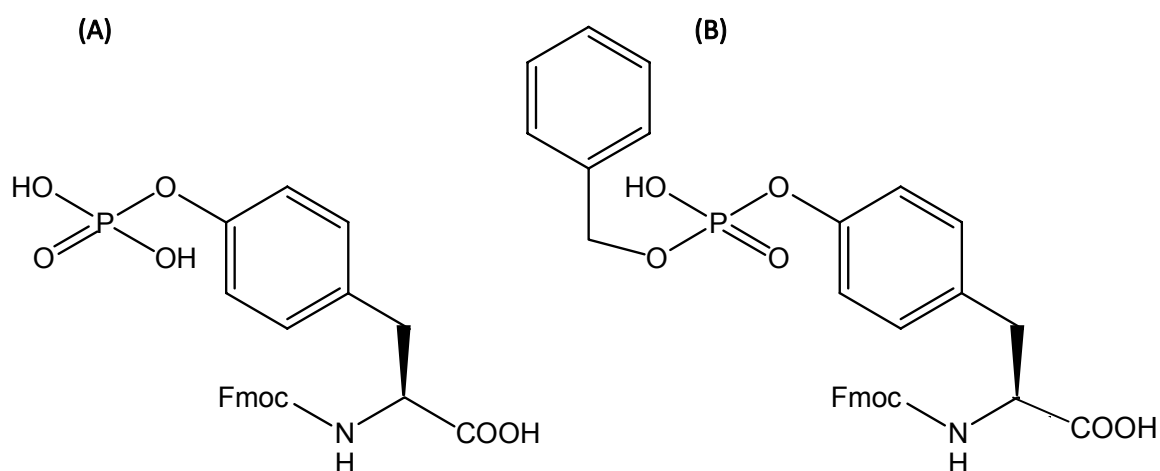


Abb. 16 Beispiele für geschützte bzw. ungeschützte Phosphotyrosinbausteine
(A) Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH und (B) Fmoc-Tyr($\text{PO}(\text{OBzl})\text{OH}$)-OH.

Bei dem Einsatz von Phosphotyrosinbausteinen kann die ungeschützte bzw. partiell geschützte Phosphatgruppe mit dem Piperidin aus vorangegangenen Fmoc-Abspaltungsschritten reagieren, was zur Bildung von Piperidiniumsalzen führt (Abb. 17). Im nachfol-

genden Schritt ist die zur Kopplung notwendige Menge an aktivierter Aminosäure reduziert, was folglich in Fehlsequenzen resultiert.

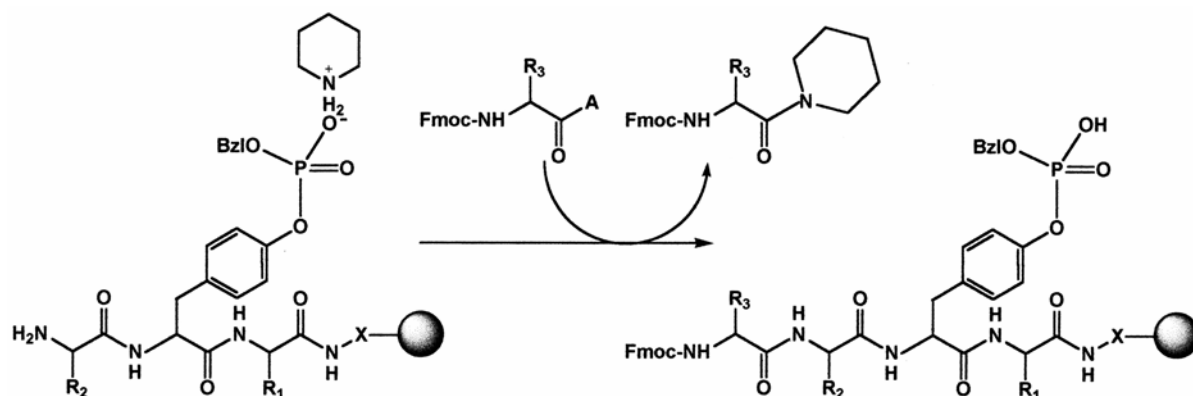


Abb. 17 Bildung von Piperidiniumsalzen [189].

Es konnte gezeigt werden, dass diese Nebenreaktion von der verwendeten Basenkonzentration abhängig ist. Eine Erhöhung der Basenkonzentration vom 2-fachen Überschuss auf den 3-fachen Überschuss, brachte eine Steigerung der Kopplungseffizienz um ca. 20%. Weiterhin wurde durch zusätzliche Waschschrirte unter Verwendung von 1,1 M DIEA/DCM und 1 M TFA/DCM eine Erhöhung der Kopplungsausbeute beobachtet [189, 190].

Die Synthese der linearen, Phosphotyrosin-haltigen Peptide der vorliegenden Arbeit erfolgte nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung von Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Beladung von 0,64 mmol/g (Abb. 18). Der Einbau von Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH begründet sich in den von IMHOF *et al.* publizierten Ergebnissen. Hierbei wurde am Beispiel der linearen Leitsequenz Ros pY²²⁶⁷ der Einbau der in Abbildung 15 dargestellten phosphorylierten Tyrosinbausteine hinsichtlich Kopplungsausbeute und Produktreinheit getestet. Für beide Synthesen wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt. Ein weiterer Vorteil von Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH gegenüber dem Monobenzyl-geschützten Phosphotyrosin liegt in der Zeit, die für die Abspaltung des Peptides bzw. der Seitenkettenschutzgruppen notwendig ist (s. Kapitel 4.2.1.1, 4.2.1.2) [66, 176]. HBTU/HOBt erwiesen sich als geeignete Reagenzien zur Kopplung der Fmoc-Aminosäuren und Fmoc-8-Amino-3,6-dioxaoctansäure (Fmoc-Ado).

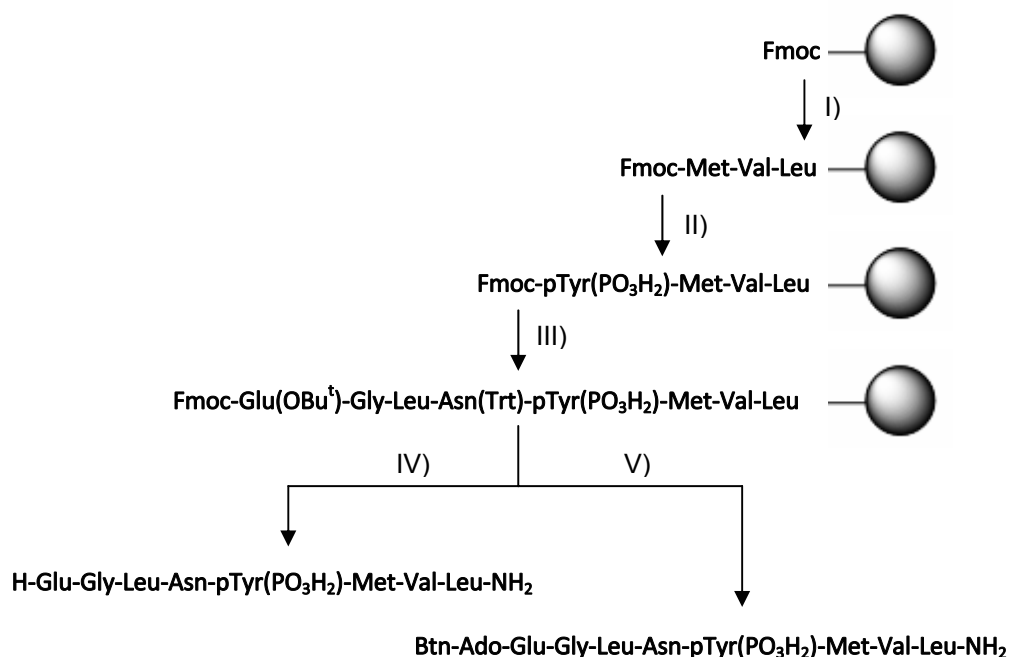


Abb. 18 Syntheschema zur Darstellung der linearen Phosphopeptide am Beispiel von Ros pY²²⁶⁷ (1).

- I) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-AS/HBTU/HOBt (4 equiv.)/DIEA (8 equiv.)
- II) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-pTyr(PO₃H₂)/HBTU/HOBt (2 equiv.)/DIEA (6 equiv.)
- III) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-AS/HBTU/HOBt (4 equiv.)/DIEA (8 equiv.), Splitten des Harzes
- IV) 20% Piperidin/DMF; 95% TFA, 2,5% TIPS, 2,5% H₂O
- V) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-Ado/HBTU/HOBt (2 equiv.)/DIEA (4 equiv.); 20% Piperidin/DMF; Biotin/PyBOP (4 equiv.)/DIEA (8 equiv.); 95% TFA, 2,5% TIPS, 2,5% H₂O

Für die biologische Testung wurden die Peptide sowohl in der N-terminal freien Form (Abb. 18, IV) als auch der N-terminal biotinylierten Form synthetisiert. Für die Kondensation von Biotin wurde PyBOP verwendet (Abb 18, V). Die zyklischen, Phosphotyrosin-haltigen Peptide wurden unter Einsatz des Monobenzyl-geschützten Phosphotyrosin-bausteins synthetisiert [46, 176, 191]. Die Ausbildung der Zyklen wurde dabei über den Einbau der Aminosäuren Lys(Alloc)-OH und Asp(OAll)-OH erreicht. Als Kopplungsreagenzien der Fmoc-Derivate wurden HBTU und HOBt verwendet. Um Nebenreaktionen mit dem N-Terminus während der Zyklisierung zu unterbinden, wurde im Fall der N-terminal freien Liganden die Fmoc-Schutzgruppe der finalen, linearen Sequenz durch die Boc-Schutzgruppe ersetzt (Abb. 19, IV) [176]. Im Anschluss an die Abspaltung der Alloc/OAll-Schutzgruppen erfolgte die Zyklisierung der Sequenzen unter Nutzung von PyBOP und DIEA (Abb. 19, VI) [46, 179]. Die Dauer der finalen Abspaltung der zyklischen Liganden vom polymeren Träger (Rink-Amid-MBHA-Harz, Beladung 0,54 mmol/g) betrug aufgrund der Monobenzylschutzgruppe am Phosphat mindestens 6 Stunden (Kapitel 4.2.1.2).

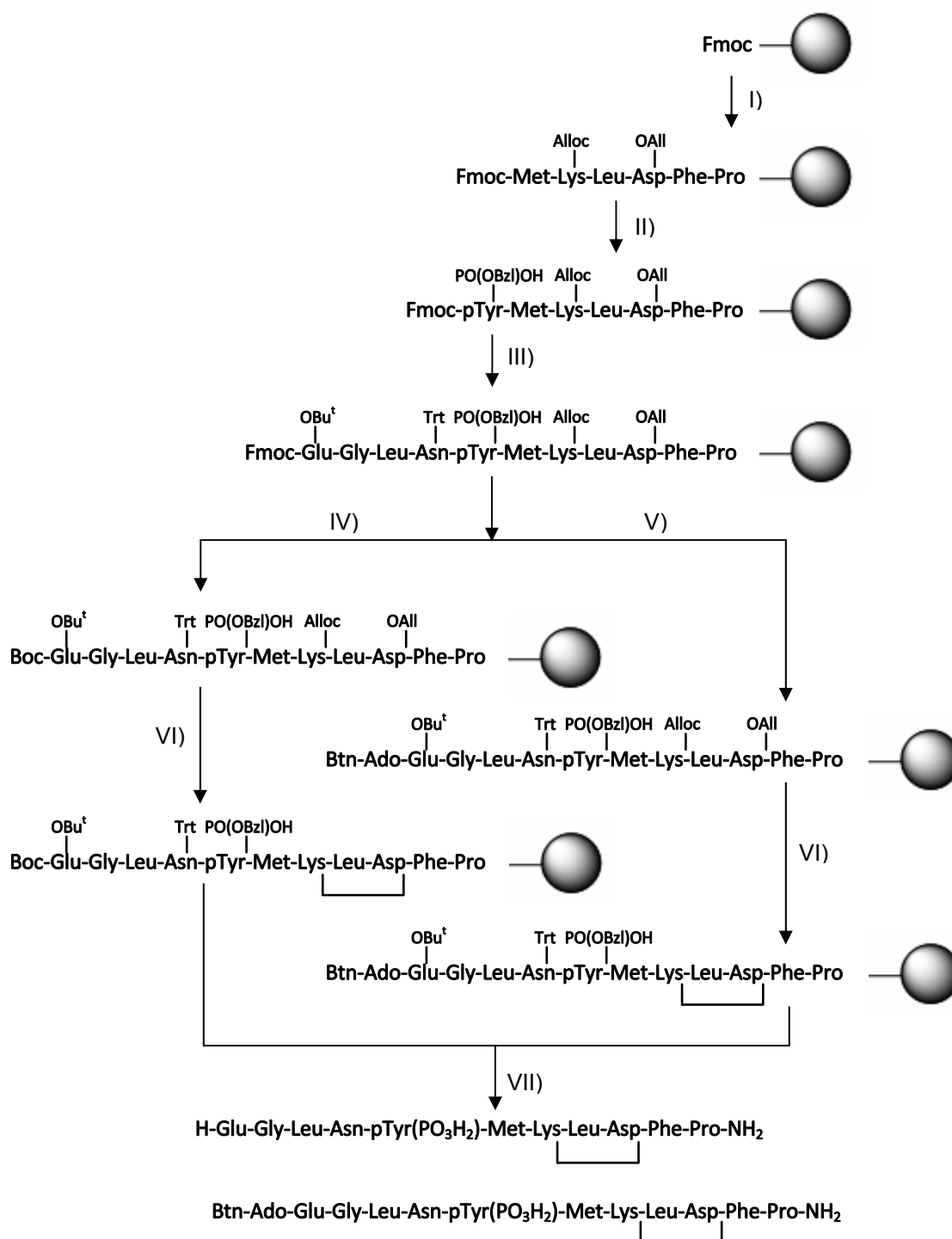


Abb. 19 Syntheschema zur Darstellung der zyklischen Phosphopeptide am Beispiel von Peptid (2).

- I) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-AS/HBTU/HOBt (4 equiv.)/DIEA (8 equiv.)
- II) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-pTyr(PO(OBzl)OH)/HBTU/HOBt (2 equiv.)/DIEA (6 equiv.)
- III) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-AS/HBTU/HOBt (4 equiv.)/DIEA (8 equiv.), Splitten des Harzes
- IV) 20% Piperidin/DMF; (Boc)₂O (5 equiv.)/DIEA (10 equiv.)
- V) 20% Piperidin/DMF; Fmoc-Ado/HBTU/HOBt (2 equiv.)/DIEA (4 equiv.); 20% Piperidin/DMF; Biotin/PyBOP (4 equiv.)/DIEA (8 equiv.)
- VI) DMF:THF:0,5N HCl:Morpholin (1:1:0,5:0,45)/Pd⁰(PPh₃)₄; PyBOP (6 equiv.)/DIEA (12 equiv.)
- VII) 95% TFA, 2,5% TIPS, 2,5% H₂O

5.3 CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHOPEPTIDLIGANDEN

Nach der Abspaltung der Peptide vom Harz, wurden die Rohprodukte mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Die gereinigten Peptidfraktionen wurden unter Verwendung der analytischen HPLC, Dünnschichtchromatographie und MALDI-MS charakterisiert. In den Tabellen 6 und 7 sind die Retentionszeiten, R_f -Werte, die theoretischen Molmassen sowie die mittels MALDI-MS gefundenen Molmassen der N-terminal freien bzw. biotinylierten Peptide aufgeführt.

Die Auswertung der durchgeführten Aminosäureanalysen (Kapitel 4.2.2.5) bestätigte den theoretischen Aminosäuregehalt der einzelnen Peptide. Weiterhin konnten die Konzentrationen von Peptidlösungen für den Phosphatase-Aktivitätstest ermittelt werden.

Tabelle 6: Charakterisierung der N-terminal freien Phosphopeptidliganden.

Peptid	Peptidsequenz	M _w [g/mol]		t _R [min] ^[d]	R _{f1} ^[e]	R _{f2} ^[f]
		theor.	gefunden			
1	EGLNpYMV L	1016,40	1016,80	20,62	0,48	0,48 ^[g]
2	EGLNpYMc[KLD]FP	1387,54	1388,66 ^[a]	25,88	0,17	0,25
3	EGLNpYMc[KLNIeFD]	1403,58	1426,99 ^[b]	32,05	0,16	0,23
4	EGLNpYMV LNIeFPAPEEE	1930,12	1953,27 ^[b]	30,63	0,17	0,26
5	LNpYMV LNIeFPAPEEE	1743,95	1767,09 ^[b]	29,61	0,16	0,26
6	pYMV LNIeFPAPEEE	1516,68	1539,50 ^[b]	27,37	0,16	0,28
7	EGLc[KpYMD]LNleFPAPEEE	1942,14	1981,17 ^[c]	31,58	0,16	0,28
8	EGLNpYc[KVD]NIeFPAPEEE	1911,02	1912,66 ^[a]	27,38	0,18	0,26
9	EGLNpYMc[KLD]FPAPEEE	1943,09	1982,99 ^[c]	26,83	0,16	0,26
10	EGLNpYMc[KLNIeFD]APEEE	1959,13	1982,57 ^[b]	31,29	0,16	0,28

^[a] [M+H]⁺, ^[b] [M+Na]⁺, ^[c] [M+K]⁺, ^[d] 10-50% Eluent B in 40 min

(Eluent A: 0,1% TFA/Wasser, Eluent B: 0,1% TFA/Acetonitril; Flussrate: 1 ml/min; λ =220 nm);

^[e] System 1: Pyridin:Essigester:Eisessig:H₂O (5:5:1:3); ^[f] System 2: Acetonitril:Wasser (1:1);

^[g] System 3: n-Butanol:Essigsäure:Wasser (48:18:24).

Analytische Daten für Peptid (1) sind aus der Promotionsarbeit von Dr. K Hampel entnommen [192].

Tabelle 7: Charakterisierung der N-terminal biotinylierten Phosphopeptidliganden.

Peptid	Peptidsequenz	M _w [g/mol]		t _R [min] ^[d]	R _{f1} ^[e]	R _{f2} ^[f]
		theor.	gefunden			
1	btn-Ado-EGLNpYMVL	1388,8	1427,70 ^[c]	20,62	0,33	0,39 ^[g]
2	btn-Ado-EGLNpYMc[KLD]FP	1759,84	1759,82	27,65	0,18	0,69
3	btn-Ado-EGLNpYMc[KLNIeFD]	1775,88	1798,46 ^[b]	33,70	0,15	0,72
4	btn-Ado-EGLNpYMVLNleFPAPEEE	2302,42	2303,40 ^[a]	31,77	0,15	0,72
5	btn-Ado-LNpYMVLNleFPAPEEE	2115,11	2138,35 ^[b]	33,92	0,15	0,72
6	btn-Ado-pYMVLNleFPAPEEE	1887,99	1911,36 ^[b]	30,08	0,15	0,70
7	btn-Ado-EGLc[KpYMD]LNleFPAPEEE	2314,44	2316,92 ^[a]	32,20	0,17	0,69
8	btn-Ado-EGLNpYc[KVD]NIleFPAPEEE	2283,72	2321,72 ^[c]	28,76	0,15	0,71
9	btn-Ado-EGLNpYMc[KLD]FPAPEEE	2315,39	2354,21 ^[c]	26,88	0,14	0,71
10	btn-Ado-EGLNpYMc[KLNIeFD]APEEE	2331,43	2332,68 ^[a]	33,56	0,15	0,71

^[a] [M+H]⁺, ^[b] [M+Na]⁺, ^[c] [M+K]⁺; ^[d] 10-50% Eluent B in 40 min

(Eluent A: 0,1% TFA/Wasser, Eluent B: 0,1% TFA/Acetonitril; Flussrate: 1 ml/min; λ=220 nm);

^[e] System 1: Pyridin:Essigester:Eisessig:H₂O (5:5:1:3); ^[f] System 2: Acetonitril:Wasser (1:1);

^[g] System 3: n-Butanol:Essigsäure:Wasser (48:18:24).

Analytische Daten für Peptid (1) sind aus der Promotionsarbeit von Dr. K Hampel entnommen [192].

5.4 BIOLOGISCHE TESTUNG

5.4.1 MODULATION DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT VON SHP-1

Die Charakterisierung der SHP-1 N-SH2-Liganden (1) bis (10) hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Phosphataseaktivität zu stimulieren bzw. zu inhibieren, erfolgte in einem Phosphatase-Aktivitätstest. Die Aktivitätsmessung wurde unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) durchgeführt. Als Substrat für die *full length* PTPase wurde *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) verwendet. Das durch Dephosphorylierung freiwerdende *p*-Nitrophenolat wurde als gelber Farbstoff bei 405 nm photometrisch bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten wurden relativ zu Ros pY²²⁶⁷ angegeben (Tab. 8).

Tabelle 8: EC₅₀-Werte und Dissoziationskonstanten der Phosphopeptidliganden (1) bis (10).

Peptide	Peptidsequenz	EC ₅₀ (μM)	K _D (μM)
1	EGLNpYML	140	1.10 ± 0.07
2	EGLNpYMc[KLD]FP	12	0.90 ± 0.04
3	EGLNpYMc[KLNIeFD]	272	>70
4	EGLNpYMLNIeFPAPEEE	43	0.07 ± 0.01
5	LNpYMLNIeFPAPEEE	35	0.74 ± 0.06
6	pYMLNIeFPAPEEE	N.A. ^[a]	N.B. ^[b]
7	EGLc[KpYMD]LNiFPAPEEE	70	0.12 ± 0.01
8	EGLNpYc[KVD]NIeFPAPEEE	647	0.50 ± 0.09
9	EGLNpYMc[KLD]FPAPEEE	144	0.34 ± 0.03
10	EGLNpYMc[KLNIeFD]APEEE	67	0.15 ± 0.01

^[a]N.A, not active; ^[b]N.B., no binding.

Der Phosphatase-Aktivitätstest ließ erkennen, dass sich die Phosphopeptidliganden (2) bis (10) in drei Gruppen einteilen lassen:

- (i) Liganden, die im Vergleich zu Ros pY²²⁶⁷ (1) stärker aktivierende Effektoren darstellen,
- (ii) Liganden mit ähnlichem Aktivierungsverhalten verglichen mit Ros pY²²⁶⁷ (1) und
- (iii) Liganden mit inhibitorischem Charakter.

Die Peptide (2) und (3) lassen sich in die Klasse von Liganden einteilen, die in Abhängigkeit ihrer Konzentration die SHP-1 Aktivität effektiver stimulieren als die Leitstruktur (1). Im Fall des zyklischen Liganden (3) konnte eine im Vergleich zu (1) verzögerte Aktivierung von SHP-1 beobachtet werden, was einen 2-fach höheren EC₅₀-Wert zur Folge hat. Im Gegensatz dazu aktivierte Peptid (2) die Phosphatase bereits bei niedrigen Konzentration bis 100 μM, wobei eine halbmaximale Aktivierung von 12 μM erreicht wurde. Bei Konzentrationen über 100 μM trat eine Inhibierung von SHP-1 auf, sodass keine weitere Steigerung der maximalen Aktivität ermittelt werden konnte (Tab. 8, Abb. 20).

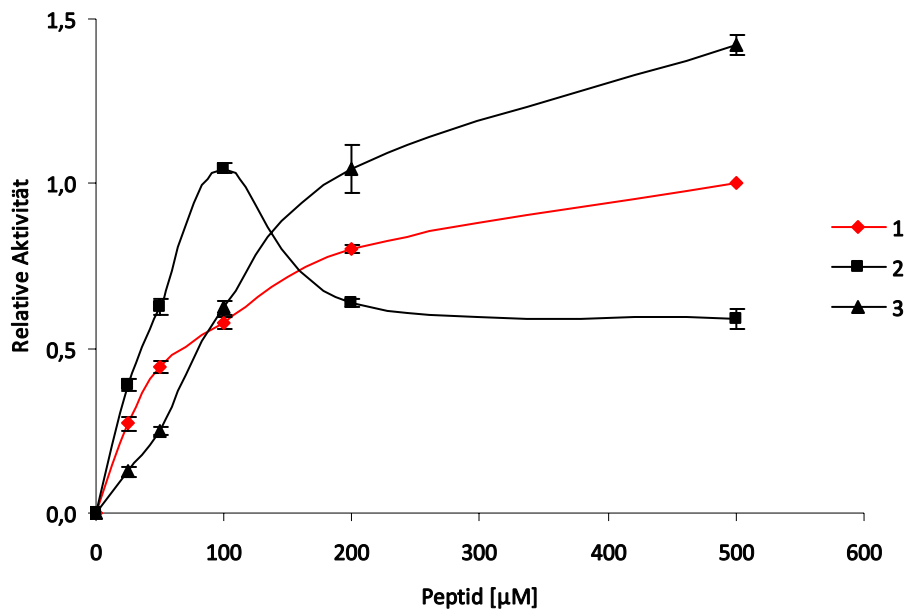


Abb. 20 Modulation der SHP-1 Aktivität durch die Liganden (2) und (3) im Vergleich zu Ros pY²²⁶⁷ (1).

Dieser Effekt wurde an ausgewählten Liganden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [44]. HAMPEL *et al.* beschrieben dieses Phänomen für die linearen SHP-1 N-SH2-Liganden EGLNpYFVh und EGLNpYFVF (h = Homophenylalanin) [46]. Offenbar stellen diese Peptide in höheren Konzentrationsbereichen auch Substrate für die PTP-Domäne dar und konkurrieren mit pNPP um die Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum von SHP-1, nachdem eine Aktivierung durch Bindung an N-SH2 im niedrigen Konzentrationsbereich effektiv stattgefunden hat. Für alle anderen Liganden dieser Arbeit konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden. Strukturell unterscheiden sich die Liganden (2) und (3) in der Größe ihrer Zyklen. Während in Peptid (2) der Ringschluss zwischen den Positionen pY+2 und pY+4 realisiert wurde, fand die Zyklisierung in dem verzögert stimulierenden Peptid (3) zwischen den Resten pY+2 und pY+6 statt (Tab. 5). Obwohl die linearen Liganden (4) und (5) eine mit Ros pY²²⁶⁷ (1) vergleichbare maximale Aktivität auslösten, wiesen beide Verbindungen geringere EC₅₀-Werte von 43 μM und 35 μM auf. Für die Leitstruktur (1) wurde ein EC₅₀-Wert von 140 μM ermittelt (Tab. 8, Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigen, dass die C-terminal verlängerten Sequenzen (4) und (5) wahrscheinlich infolge der optimalen Besetzung der Bindungstaschen für die Reste pY+3 bis pY+5 die Aktivierung der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 ebenfalls effizient hervorrufen.

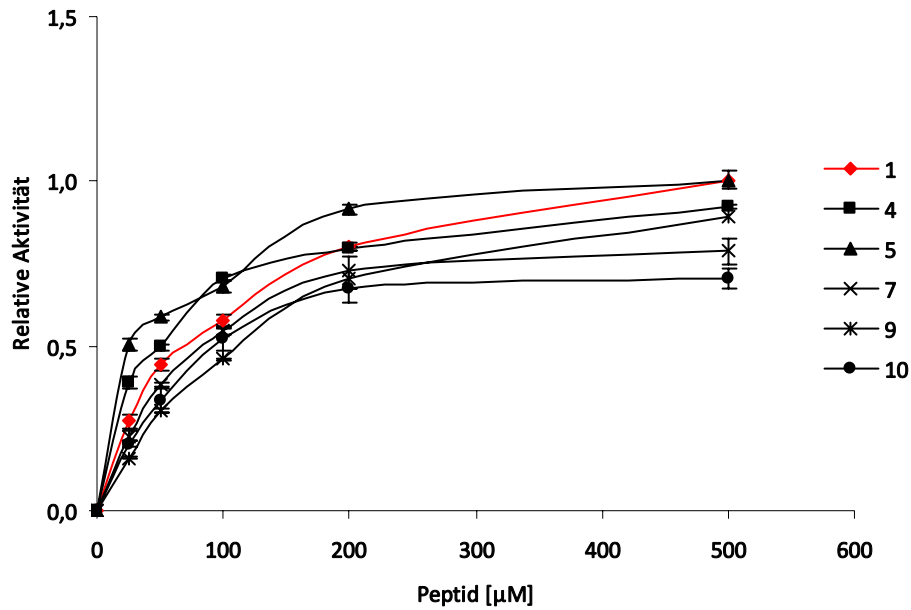


Abb. 21 Konzentrationsabhängige Modulation der SHP-1 Aktivität durch Phosphopeptidliganden im Vergleich zu Ros pY²²⁶⁷ (1).

Die Annahme, dass diese Peptidverlängerung jedoch die Sequenzreduzierung um die Reste pY-2 und pY-1 kompensieren kann, wurde nicht bestätigt, denn der N-terminal verkürzte Ligand (6) bewirkte keine Aktivierung der Enzymaktivität (Tab. 8, Abb. 21). Hinsichtlich der halbmaximalen Aktivierung erwies sich, neben den Peptiden (4) und (5), der zyklische Ligand (2) als einer der effizientesten SHP-1 Aktivatoren.

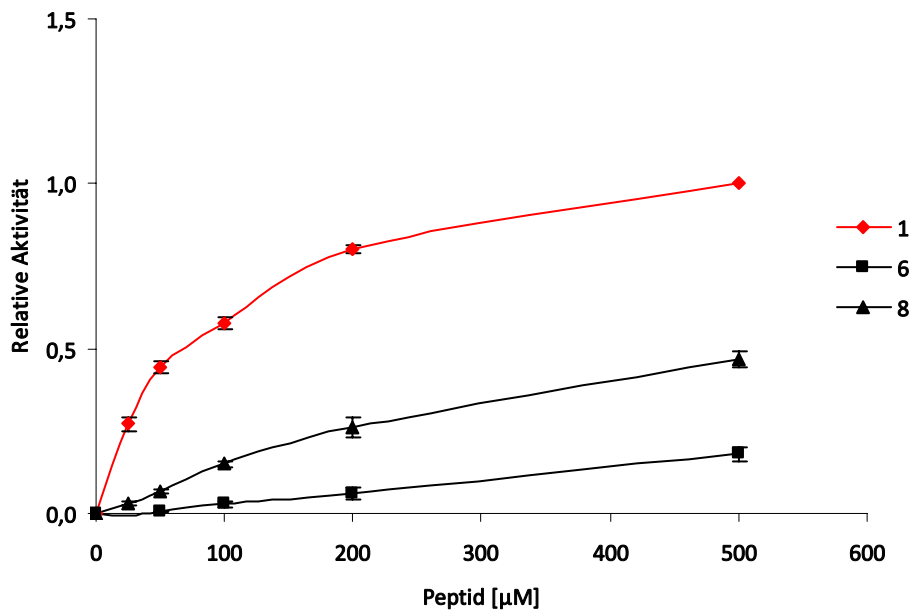


Abb. 22 Modulation der SHP-1 Aktivität durch die Liganden (6) und (8) im Vergleich zu Ros pY²²⁶⁷ (1).

Für das bivalente, zyklische Peptid (**8**) konnte, im Gegensatz zu Ros pY²²⁶⁷ (**1**) mit 647 μ M ein signifikant höherer EC₅₀-Wert bestimmt werden (Abb. 22).

Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten der Liganden (**2**) und (**9**) in den Positionen pY-4 bis pY+6, stimulierten beide Peptide die SHP-1 Aktivität mit unterschiedlichem Profil (Abb. 20 und 21). Dies konnte auch für die Liganden (**3**) und (**10**) beobachtet werden. Es wird daher angenommen, dass sich dieser Effekt mit der C-terminalen Sequenzverlängerung erklären lässt.

Mit Ausnahme der Verbindung (**8**), zeigen die zyklischen Liganden (**7**), (**9**) und (**10**) ein ähnliches Aktivierungsverhalten. Es scheint, dass bei den zuletzt genannten Verbindungen weder die Ringgröße noch die -position einen großen Einfluss auf die Aktivierung von SHP-1 haben.

5.4.2 BESTIMMUNG DER BINDUNGS-AFFINITÄT FÜR DIE N-SH2-DOMÄNE

Das Prinzip der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) beruht auf der Erfassung biomolekularer Interaktionen in Echtzeit ohne die Verwendung von Markierungen der Interaktionspartner. Grundlage der Interaktionsmessungen bildet die Immobilisierung von Biomolekülen (Ligand) auf einer mit Gold beschichteten Oberfläche (Sensorchip). Durch Zugabe verschiedener Konzentrationen des Liganden über den Sensorchip kann unter Verwendung dieser Methode sowohl die Reaktionskinetik als auch die Affinität des Liganden zum Analyten, durch die Analyse der resultierenden Signale bestimmt werden. Trifft polarisierte, monochromatische Strahlung auf die Goldoberfläche des Sensorchips kommt es zur Totalreflektion. Die Ausbildung sogenannter Oberflächenplasmonen erfolgt durch die Interaktion des einfallenden Lichtes mit den freien Elektronen der Goldoberfläche. Dies hat die Änderung des Brechungsindex der Lösung an der Oberfläche sowie des Resonanzwinkels zur Folge. Die Änderung des Brechungsindex ist proportional zu der Menge an Analyten, die durch Immobilisierung des Liganden an die Oberfläche des Sensorchips gebunden hat. Die für das SPR Signal verwendete Einheit ist die *resonance unit* (RU) [193].

Die Bindungsstudien wurden unter Verwendung der biotinylierten Peptidliganden durchgeführt. Diese wurden dabei auf einem Streptavidin beschichteten Sensorchip gebunden

und die frisch aufgereinigte N-SH2 Domäne als Analyt, in verschiedenen Konzentrationen über die immobilisierte Chipoberfläche geleitet. Um die Flexibilität der Liganden auf dem Chip zu gewährleisten, wurde vor die Biotingruppe ein Linker aus 8-Amino-3,6-dioxaoktansäure (Ado) gekoppelt.

Die Auswertung der erhaltenen Sensogramme erfolgte unter Verwendung des *steady-state*-Modells der BIAevaluation Software 2.0. Dabei konnte für die Leitstruktur Ros pY²²⁶⁷ eine Dissoziationskonstante (K_D) von $1,10 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ermittelt werden (Tab. 8, Abb. 23). Ein vergleichbarer K_D -Wert für dieses Oktapeptid wurde durch HAMPEL *et al.* beschrieben [46].

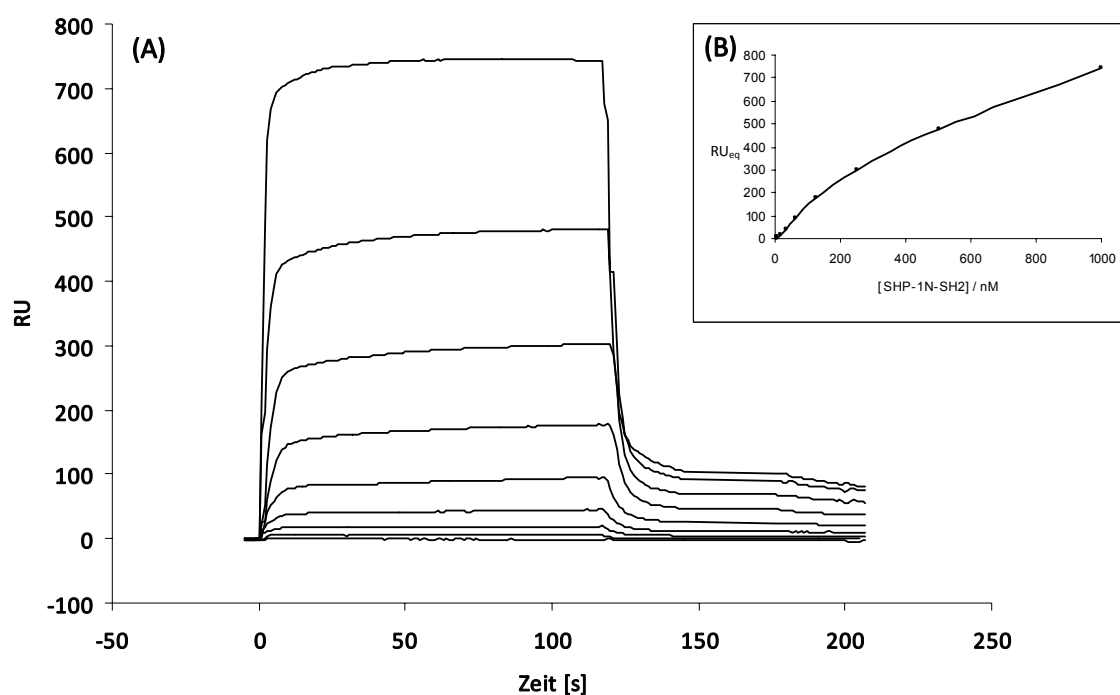


Abb. 23 (A) Sensogramm für die Interaktion zwischen der GST-N-SH2-Domäne und Ros pY²²⁶⁷ (1).
(B) Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Bindung.

Die Bindungsaffinitäten der linearen Peptide (4), (5) und (6) zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen den strukturellen Unterschieden in der N-terminalen Region und den ermittelten K_D -Werten. Mit $0,07 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ließ sich für die Verbindung (4) die geringste Dissoziationskonstante bestimmen, wovon sich im Vergleich zu den Peptiden (5) und (6) eine stärkere Bindungsaffinität für die GST-N-SH2-Domäne ableiten lässt. Der K_D -Wert des Peptides (5) liegt im ähnlichen Konzentrationsbereich wie der für den natürli-

chen Interaktionspartner Ros pY²²⁶⁷ (1), während sich für den Liganden (6) keine Assoziation mit der GST-N-SH2-Domäne nachweisen ließ (Tab. 8). Diese Beobachtung lässt sich auf das Fehlen des für die Erkennung essentiellen Restes in pY+2 innerhalb der Verbindung (4) zurückführen. Die N-terminale Verkürzung um die Reste pY-4 bis pY-1 (Glu-Gly-Leu-Asn) konnte somit nicht durch die C-terminale Sequenzverlängerung um die Reste Nle-Phe in pY+4 und pY+5 kompensiert werden. Neben Peptid (4) stellten sich die Liganden (7), (9) und (10) als gute Bindungspartner der GST-N-SH2-Domäne heraus. Dabei wurden Dissoziationskonstanten im Bereich von 0,12 μM bis 0,34 μM ermittelt (Tab. 8, Abb. 24). Diese Ergebnisse korrelieren gut mit dem Potential der Peptide, die Phosphataseaktivität zu stimulieren.

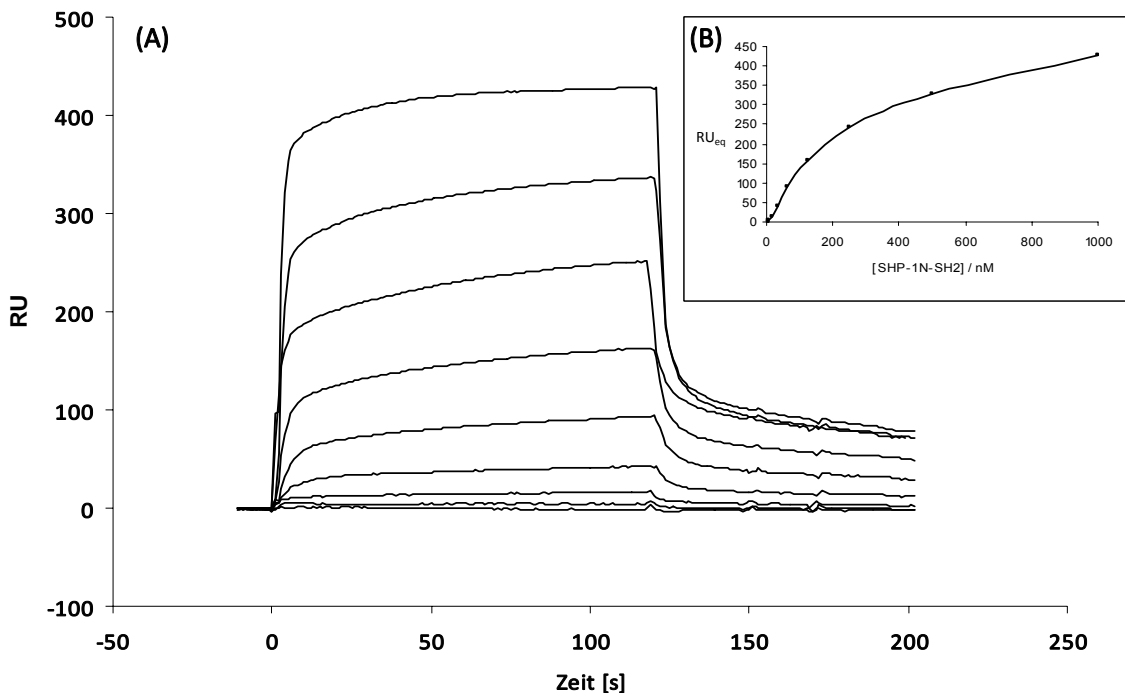


Abb. 24 (A) Sensogramm für die Interaktion zwischen der GST-N-SH2-Domäne und Ligand (9).
 (B) Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Bindung.

Der zyklische Ligand (2) wies eine ähnliche Affinität für die GST-N-SH2-Domäne, wie Ros pY²²⁶⁷ (1) auf. Allerdings wurde die Stimulation der Phosphataseaktivität durch (2) nur in einem Konzentrationsbereich bis 100 μM hervorgerufen (Tab. 8, Abb. 20). Im Vergleich zu anderen Peptiden zeigte Ligand (3) eine stark herabgesetzte Bindungaffinität, die sich mit der verzögerten Stimulation der Phosphataseaktivität vereinbaren lässt ($\text{EC}_{50} = 272 \mu\text{M}$).

Hinsichtlich des Wirkungseffektes bei Peptidkonzentrationen höher als 200 μ M zeigten sich allerdings Widersprüche, die es noch zu klären gilt (Tab. 8, Abb. 20).

Als potentieller Inhibitor der SHP-1 Aktivität kristallisierte sich das zyklische Phosphopeptid (**8**) heraus. Das über die für die Erkennung wichtigen Reste pY+1 und pY+3 zyklisierte Peptid, konnte als hochaffiner Bindungspartner für die GST-N-SH2-Domäne identifiziert werden. Außerdem besitzt der Ligand inhibitorische Eigenschaften hinsichtlich der SHP-1 Aktivität.

5.4.3 DOCKINGSTUDIEN ZUR ASSOZIATION DER PHOSPHOPEPTIDLIGANDEN AN DIE SHP-1 N-SH2-DOMÄNE

Für die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse des Phosphatase-Aktivitätstests und der Bindungsstudien war es notwendig, die Phosphopeptidliganden hinsichtlich ihrer Passfähigkeit in die N-SH2-Domäne mittels theoretischen Dockings zu charakterisieren. Da gegenwärtig eine Kristallstruktur der Peptid-komplexierten N-SH2-Domäne von SHP-1 nicht zur Verfügung steht, wurde die in ihrer Struktur ähnliche N-SH2-Domäne von SHP-2 genutzt.

Tabelle 9: Ermittelte Bindungsmodi für die Phosphopeptidliganden 1-10.

Peptid	Sequenz	Bindungsmodus
1	EGLNpYMVL-NH ₂ (Ros pY ²²⁶⁷)	Modus II
2	EGLNpYMc[KLD]FP-NH ₂	Modus II
3	EGLNpYMc[KLN/eFD]-NH ₂	Modus I
4	EGLNpYMVLN/eFPAPEEE-NH ₂	Modus I und II
5	__LNpYMVLN/eFPAPEEE-NH ₂	Modus I und II
6	____pYMVLN/eFPAPEEE-NH ₂	Modus I und II
7	EGLc[KpYMD]LN/eFPAPEEE-NH ₂	Modus I und II
8	EGLNpYc[KVD]N/eFPAPEEE-NH ₂	Modus I
9	EGLNpYMc[KLD]FPAPEEE-NH ₂	Modus I und II
10	EGLNpYMc[KLN/eFD]APEEE-NH ₂	Modus I

Die Phosphopeptidliganden (**2-10**) wurden in die verfügbaren Kristallstrukturen PDB1AYA (N-SH2 in Komplex mit VLpYTAV) und PDB1AYC (N-SH2 in Komplex mit GGpYMAMG) durch Substitutionen und Additionen im C-Terminus des jeweils gebundenen Peptides eingearbeitet [30, 169]. Wie von HAMPEL *et al.* beschrieben bindet die lineare Leitstruktur Ros pY²²⁶⁷ im Bindungsmodus Klasse II, der auf einer gestreckten Bindungskonformation beruht (Tab. 9) [46]. Dieser Modus resultiert in der Aktivierung von SHP-1. Die durchgeführten Dockingexperimente zeigen, dass auch der zyklische Ligand (**2**) im Bindungsmodus II an die N-SH2-Domäne von SHP-1 assoziiert (Abb. 25D), was in einer starken Bindung und effizienten SHP-1 Aktivierung resultiert (Tab. 8, Abb. 20). Ebenfalls in gestreckter Konformation und somit im Bindungsmodus II bindet der über die Aminosäurepositionen pY-1 und pY+2 zyklisierte Ligand (**7**). Die Einbindung eines längeren Sequenzabschnittes in den Zyklus des Liganden (**3**) (pY+2 bis pY+6) lässt sterisch dagegen nur eine Assoziation an die N-SH2-Domäne im Bindungsmodus I zu, der einen Knick im Peptidrückgrat zwischen den Positionen pY+2 und pY+3 involviert. Der durch diese Zyklisierung verursachte Knick führt zur Verkürzung des Abstandes zwischen den am Zyklus beteiligten Resten (Abb. 25C). Diese Zyklisierung ist demnach inkompatibel mit engen Kontakten des C-Terminus des Peptidliganden (Abb. 25C), was in einer schwächeren Bindung (70 μ M) des Peptides (**3**) gegenüber dem Peptid (**2**) (12 μ M) resultiert. Für den Bindungsmodus II ist die Distanz für die Zyklisierung zu groß, ohne die Konformation des Peptides an der Bindungsstelle zu beeinflussen. In Übereinstimmung mit dem Modell, dass nur die Klasse II Peptidbindung eine effiziente Aktivierung erlaubt, bindet Peptid (**3**) zwar, zeigt aber im niedrigen Konzentrationsbereich (bis 150 μ M) nur eine schwächere Aktivierung. Eine Zyklisierung, die die Reste pY+1 und pY+3 (Peptid **8**) involviert, ist nur im Bindungsmodus I möglich, weil in diesem Bindungsmodus die Seitenketten der beiden Aminosäuren einen für das Zustandekommen der Zyklisierung ausreichend kurzen Abstand (Kontakt) besitzen. Die konformationelle Einschränkung zu Bindungsmodus I resultiert in einer nur schwachen Aktivierung der Phosphatase. Im Allgemeinen ergeben die zusätzlichen sauren Reste im C-Terminus eine Steigerung der Bindungsaffinität und auch Aktivierung, wenn die Zyklisierung kompatibel mit dem Bindungsmodus II ist (siehe oben), wahrscheinlich aufgrund der in Abbildung 13 vorgeschlagenen zusätzlichen Interaktionen.

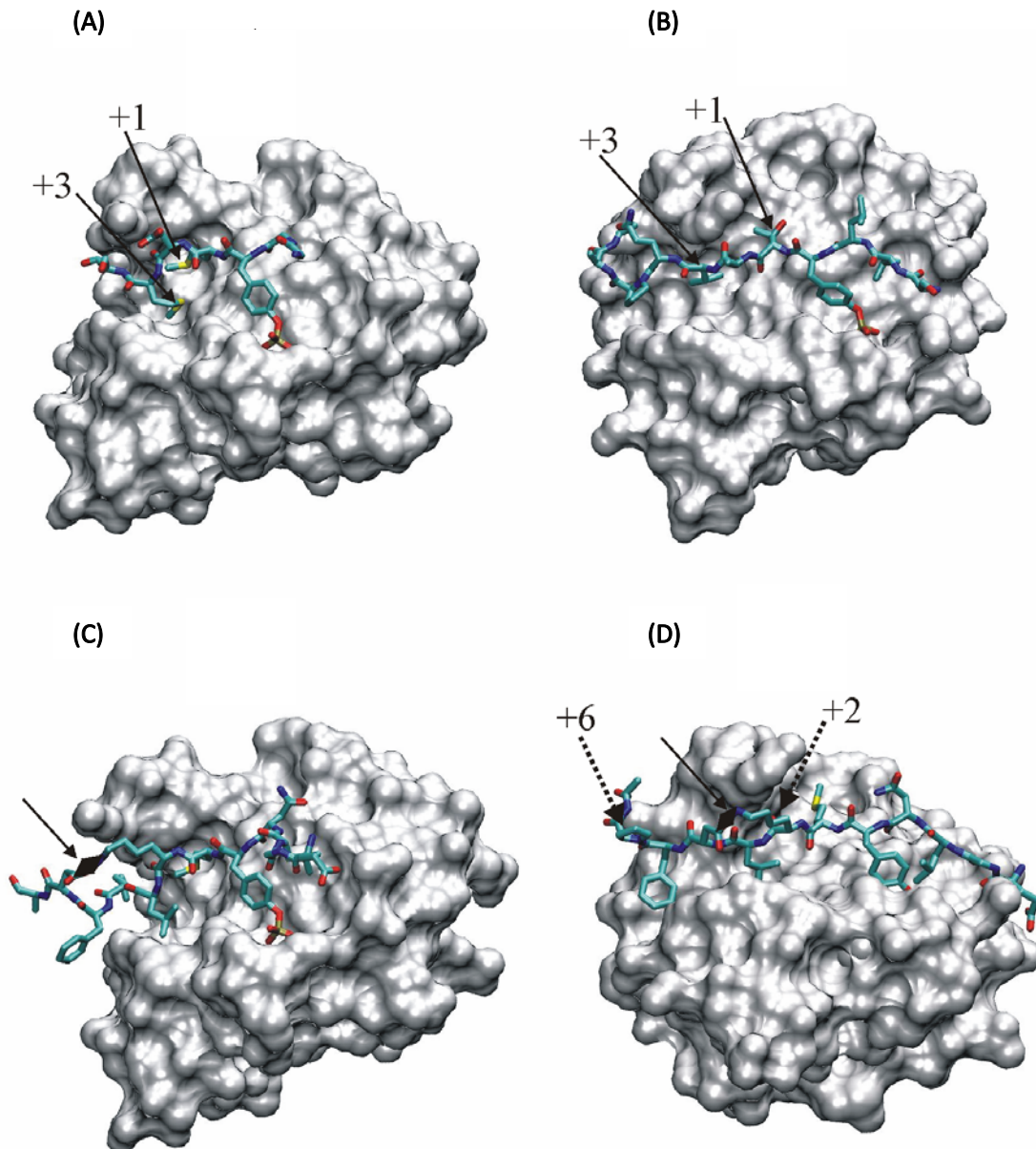


Abb. 25 Dockingexperimente durch Bindung linearer und zyklischer Peptide an die SHP-1 N-SH2-Domäne.

(A) Peptidbindung im Modus I, basierend auf der Kristallstruktur PDB1AYC im Komplex mit GGpYMDMS. Die räumliche Nachbarschaft der Met-Reste (gekennzeichnet durch Pfeile) ist kompatibel mit dem Zyklus in Ligand (8).

(B) Peptidbindung im Modus II, basierend auf der Kristallstruktur PDB1AYA. Pfeile kennzeichnen die Aminosäurereste in pY+1 und pY+3.

(C) Bindung des Liganden (3) im Modus I, PDB1AYC, der Pfeil kennzeichnet die Zyklisierung zwischen pY+2 und pY+6

(D) Bindung des Liganden (2) im Modus II, der durchgehende Pfeil kennzeichnet die Zyklisierung zwischen pY+2 und pY+4, die gepunkteten Pfeile markieren die Positionen pY+2 und pY+6 Die Peptide sind in Stick-Darstellung abgebildet.

5.5 DARSTELLUNG DES RÜCKGRAT-SEITENKETTEN-ZYKLISCHEN PEPTIDES

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass konformativ eingeschränkte lineare und zyklische Peptide abgeleitet vom natürlichen Interaktionspartner Ros pY²²⁶⁷ sich als hoch-affine Liganden für die N-SH2-Domäne von SHP-1 herausstellten. Die konformationelle Einschränkung durch Zyklisierung führte dabei zur Entwicklung von partiell inhibierenden Liganden. Die Realisierung der Zyklisierung erfolgte dabei unter Verwendung der Aminosäuren in den Positionen pY-1 und pY+2, um die Bindung der Liganden an die N-SH2-Domäne nicht zu beeinträchtigen [46, 176, 177]. Die Erhöhung der Bindungsaffinität durch den Einbau zyklischer Strukturen konnte auch bei der Entwicklung von wirksamen Inhibitoren in anderen Studien beobachtet werden [191, 194, 195].

Molecular Modeling Studien ließen erkennen, dass eine C-terminale Verschiebung der Ringstruktur, insbesondere in die Position des Phosphotyrosinrestes sich positiv auf das Bindungsverhalten der Liganden auswirken könnte. Gleichzeitig wird vermutet, dass die Dissoziation des N-SH2-PTP-Komplexes, die für die Stimulation der SHP-1 Aktivität verantwortlich ist, erschwert sein wird. Ein aufgrund dieser Untersuchungen vorgeschlagener N-SH2-Ligand ist in Abbildung 26 dargestellt.

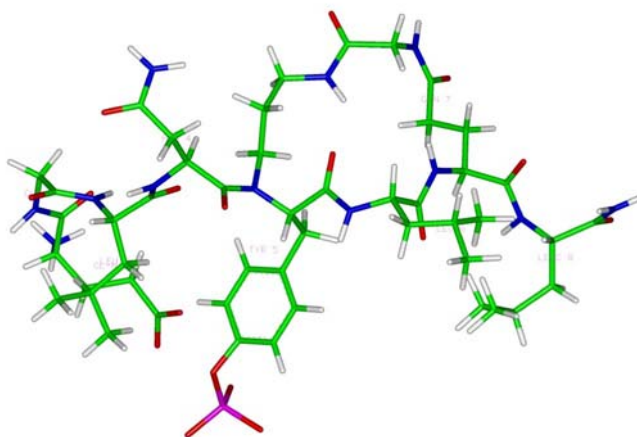


Abb. 26 Stick-Darstellung des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden für die SHP-1-N-SH2-Domäne.

Zur Generierung solcher zyklischer Phosphopeptide war die Analyse von verschiedenen Synthesestrategien notwendig, da bis dato keine Protokolle zur Darstellung rückgratzyklischer Phosphopeptide bekannt waren. Dabei wurde u.a. der Einbau von geschützten N-alkylierten Phosphoaminosäurebausteinen mit dem Einbau von N-alkylierten Tyrosinbausteinen und deren postsynthetische Phosphorylierung verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Einführung von N-alkylierten Phosphotyrosinbausteinen und die anschließende Zyklisierung, die diesen Baustein involviert, beschrieben. Zwar wurde kürzlich über rückgratzyklische Phosphoserinpeptide berichtet, die in der Lage sind NF- κ B zu inhibieren, allerdings enthalten diese Peptide keine N-modifizierten Phosphoserinreste. Die Realisierung der Zyklisierung erfolgte hierbei ausschließlich über N-carboxyalkylierte und N-aminoalkylierte Aminosäuren, die sich jeweils von Asparaginsäure und Glycin ableiten. Zusätzlich befindet sich Phosphoserin in diesen Sequenzen, ist aber nicht am Ringschluss beteiligt [196].

Die Darstellung des in Abbildung 26 dargestellten N-Rückgrat-Seitenketten-zyklisierten Liganden EGLNc Ψ [CON((CH₂)₃NH)pYNleE(NHCH₂CO)]L-NH₂ erfolgte schrittweise unter Verwendung von verschiedenen Synthesestrategien. Zu Beginn wurde der Einbau der Phosphatgruppe in eine Modellsequenz (LNYMVL-NH₂), abgeleitet von der hochaffinen Ros-Sequenz mittels postsynthetischer Phosphorylierung untersucht (Abb. 27).

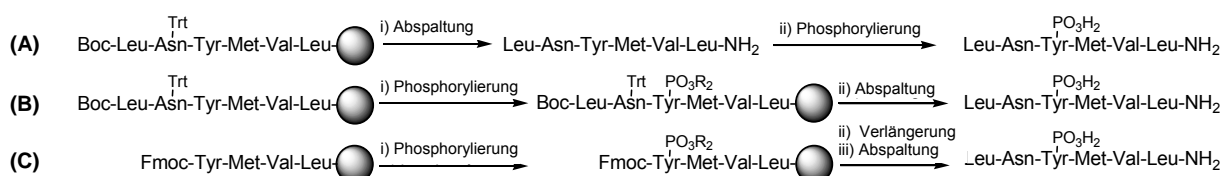


Abb. 27 Testung verschiedener postsynthetischer Phosphorylierungsstrategien anhand des Modellpeptides LNYMVL-NH₂, R = *tert* butyl.

Während bei Strategie A die Phosphorylierung in Lösung nach Synthese der kompletten Peptidsequenz durchgeführt wurde [197], kam bei den Strategien B und C die Phosphorylierung an der festen Phase zum Einsatz [198-202]. Die beiden letzteren Strategien unterscheiden sich dabei im Zeitpunkt der Phosphorylierung während der Synthese (Abb. 27B und C). Für eine optimale Phosphorylierung wurden verschieden geschützte Phosphoramidite als effiziente Phosphorylierungsreagenzien beschrieben [188, 198-203]. Die nachfolgende Oxidation des Tyrosinylphosphotriesters erfolgt am effektivsten unter Verwendung von *m*-Chlorperoxybenzoesäure (*m*CPBA). Diese Methode ist jedoch bei methioninhalten Sequenzen, wie z.B. dem verwendeten Modellpeptid, limitiert. Während Methionin durch Zugabe von *m*CPBA irreversibel oxidiert wird konnten ANDREWS *et al.* zeigen, dass der Einsatz von *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BuOOH) für die Oxidation geeignet ist und

die anschließende Behandlung mit N-Methyl-Mercaptoacetamid zur Regeneration der Methioninreste führt [180]. Sowohl das harzgebundene als auch das gereinigte Modellpeptide wurden unter Verwendung von Dibenzyl-N,N-diethylphosphoramidit $(\text{Et})_2\text{NP}[\text{O}^t\text{Bzl}]_2$ und Di-*tert*-butyl-N,N-diethylphosphoramidit $(\text{Et})_2\text{NP}[\text{O}^t\text{Bu}]_2$ phosphoryliert. Dabei wurden die in der Literatur beschriebenen Ausbeuten von 96% bzw. 95% bestätigt. Für die weiteren Strategien wurde aufgrund der längeren Abspaltungszeiten auf den Einsatz von Dibenzyl-N,N-diethylphosphoramidit verzichtet [46, 176, 177]. Weiterhin konnte *t*-BuOOH als geeignetes Oxidationsreagenz, hinsichtlich des in der Sequenz vorhandenen Methionins identifiziert werden. Aufgrund der geringen Zahl an Aufreinigungsschritten während der Peptidsynthese an der festen Phase und den höheren Ausbeuten, wurde für die Generierung des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Peptides die Phosphorylierung an der festen Phase bevorzugt (Abb. 27B und C).

Begleitend zu diesen Versuchen wurden verschiedene Experimente zum Einbau des N-(Alloc-aminopropyl)-Tyrosinbausteins in phosphorylierter bzw. unphosphorylierter Form durchgeführt (Abb. 28).

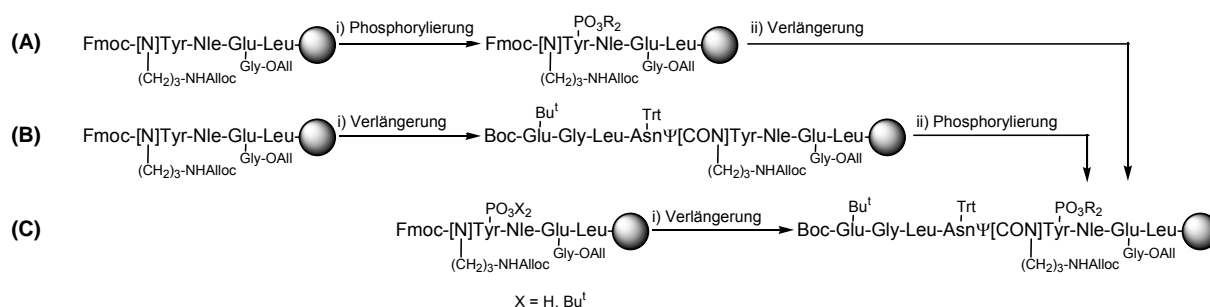
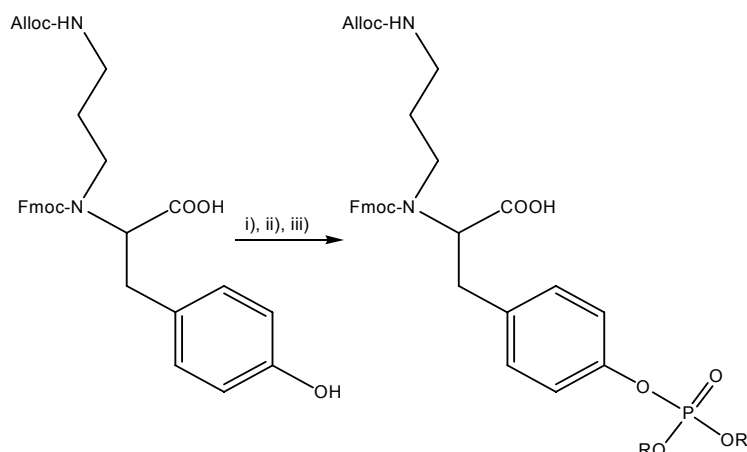


Abb. 28 Einbau des N-(Alloc-aminopropyl)-Tyrosinbausteins (A, B) in unphosphorylierter bzw. (C) phosphorylierter Form, R = *tert* butyl, X = H, *tert* butyl.

Die Darstellung von N-alkylierten Aminosäuren wurde in einer Reihe von Publikationen beschrieben [179, 181, 182, 196], jedoch nicht die eines phosphorylierten Bausteins. Bereits 1989 publizierten PERICH und JOHNS die „one-pot“-Synthese eines Boc-geschützten Dialkylphosphotyrosinderivates unter Verwendung von Dialkyl-N,N-diethylphosphoramidit und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) [204]. Diese Methode wurde später für die Generierung eines Fmoc-geschützten Dialkylphosphotyrosinbausteins angewandt [198, 201]. Der Einsatz von Diisopropylethylamin als geeignete Base während der Sily-

lierung anstelle von N-Methylmorpholin schlugen MATHÈ *et al.* vor [205]. Diese beschriebenen Synthesansätze ließen die Darstellung des phosphorylierten N-(Alloc-aminopropyl)-Tyrosinbausteins für die Synthese des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklisierten Liganden zu (Abb. 29A). Dabei ist festzuhalten, dass das Weglassen von TBDMS-Cl zur temporären Silylierung während der Synthese nicht zum gewünschten Produkt führt (Abb. 29B).

(A)



(B)

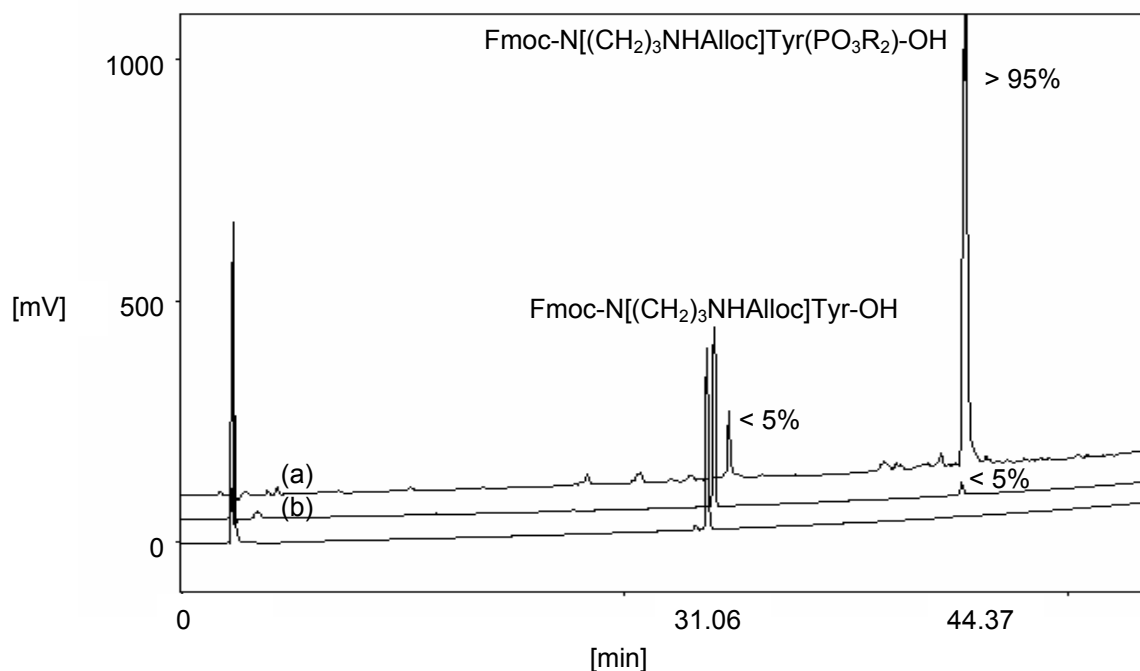


Abb. 29 (A) Darstellung von Fmoc-N[(CH₂)₃NHAlloc]Tyr(PO₃Bu^t)₂-OH unter Verwendung von i) TBDMS-Cl (1,2 equiv.)/DIEA/THF [205]; ii) 1H-Tetrazol (3equiv.)/(Et)₂NP[O^tBu]₂ (1,2 equiv.) [198-202]; iii) *t*-BuOOH (70%) [180].
(B) HPLC-Analyse der Überführung des unphosphorylierten zum phosphorylierten N-alkylierten Phosphotyrosinbausteins (a) mit und (b) ohne TBDMS-Cl; R = *tert*-butyl. Gradient: 20–80% Eluent B in 60 min mit Eluent A: 0,1% TFA in Wasser and B: 0,1% TFA in Acetonitril, Flussrate: 1 ml/min, 220 nm.

Grundlage für die in Abbildung 30 dargestellten Strategien zur Synthese des vorgeschlagenen N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden bilden die Resultate der in Abbildungen 27 und 28 dargestellten Experimente.

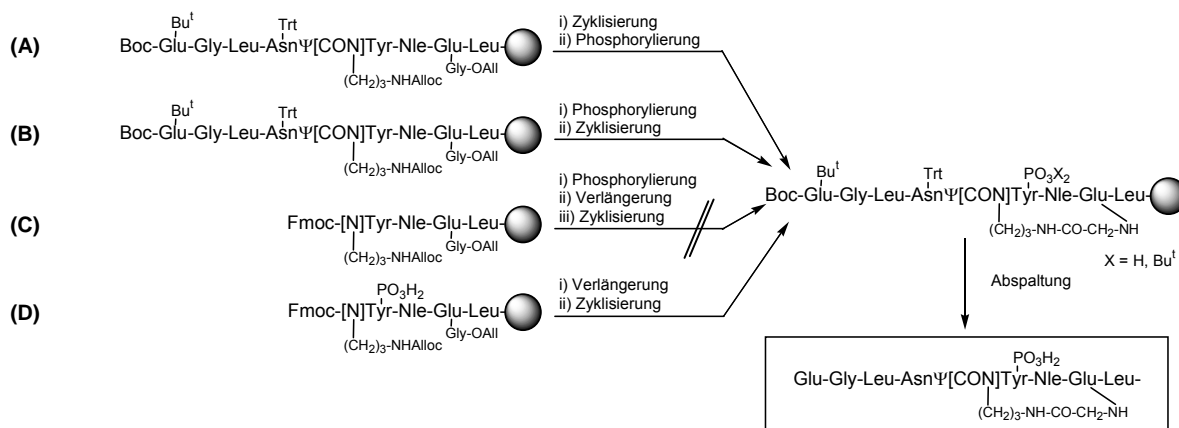


Abb. 30 Ausgewählte Synthesestrategien zur Generierung des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden $\text{EGLNc}\Psi[\text{CON}((\text{CH}_2)_3\text{NH})\text{pYNleE}(\text{NHCH}_2\text{CO})]\text{L-NH}_2$, $\text{R} = \text{tert butyl}$, $\text{X} = \text{H}, \text{tert butyl}$.

Die Kombination dieser Resultate führte zur Entwicklung von 4 Synthesewegen:

- (A) Peptidsynthese an der festen Phase - Zyklisierung - Phosphorylierung
- (B) Peptidsynthese an der festen Phase - Phosphorylierung - Zyklisierung
- (C) Peptidsynthese an der festen Phase bis zum N-(Alloc-aminopropyl)-Tyrosin – Phosphorylierung - Sequenzverlängerung - Zyklisierung
- (D) Peptidsynthese an der festen Phase unter Verwendung des Phosphat-ungeschützten N-(Alloc-aminopropyl)-Phosphotyrosins - Zyklisierung

Verschiedene Studien zeigten, dass sich der Einbau von N-alkylierten Aminosäurebausteinen bei der Festphasenpeptidsynthese, aufgrund der sterischen Hinderung des nachfolgenden Acylierungsschrittes als schwierig erwies. Deshalb wurde in der Vergangenheit auf die Darstellung von Dipeptidblöcken verwiesen [179, 181, 182]. In diesen Arbeiten wurde ebenfalls gezeigt, dass effiziente Kopplungen zur Generation der Dipeptidblöcke mit Hilfe von Aminosäurechloriden und –fluoriden erzielt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Nutzung von TFFH, einem Kopplungsreagenz welches *in situ* Aminosäurefluoride generiert, akzeptable Kopplungsausbeuten von 40-50% erreicht werden können (Abb. 31).

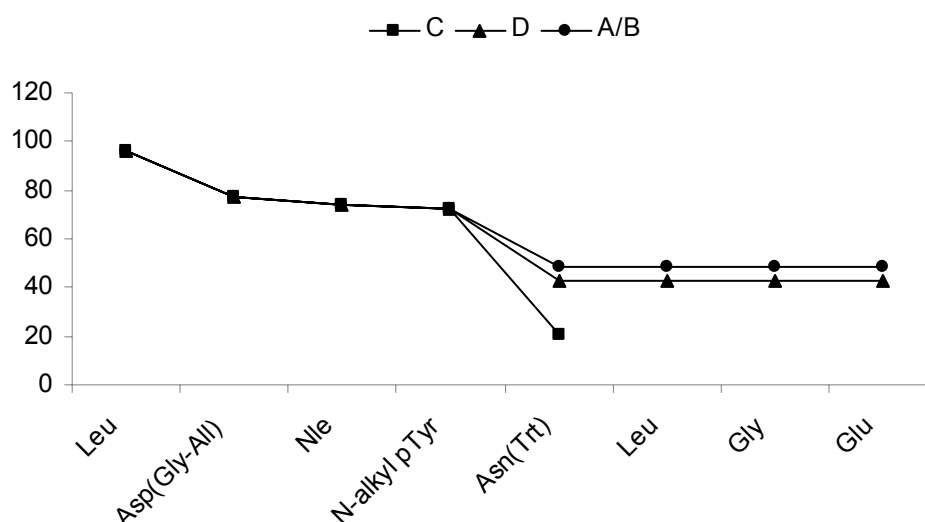


Abb. 31 Erhaltene Kopplungsausbeuten aus der Synthese der linearen Sequenz des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden, abgeleitet aus Abbildung 29.

Die Strategien A und B (Abb. 30) zeigen nach der Kopplung von Fmoc-Asn(Trt) eine Abnahme der Kopplungsausbeuten (Abb. 31). Dennoch konnte die komplette lineare Sequenz synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu führte der Einbau des di-*tert*-butylgeschützten N-(Alloc-aminopropyl)-Phosphotyrosinbausteins zur Sequenzterminierung auf der Stufe von Fmoc-Asn(Trt) (Abb. 30C, Abb. 31). Ein möglicher Grund hierfür ist die sterische Hinderung durch den „*building block*“ bzw. der zusätzlichen Schutzgruppen der Phosphatgruppe des Tyrosins. Daraufhin erfolgte der Einbau des ungeschützten N-(Alloc-aminopropyl)-Phosphotyrosinbausteins (Abb. 30D). Wie in Abbildung 31 dargestellt war es möglich, diese Strategie zu realisieren. Die Kopplungsausbeute ist mit 43%, im Vergleich zu den Strategien A und B (48%) geringfügig gemindert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass neben der Phosphorylierung an der festen Phase auch der Einbau von N-(Alloc-aminopropyl)-Phosphotyrosinbausteinen in die Sequenz zu dem gewünschten Ergebnis führte. Weiterhin ist es von Vorteil, zuerst die Phosphorylierung an der festen Phase durchzuführen und anschließend den Liganden zu zyklisieren. Dies konnte bereits bei der Synthese von zyklischen, Phosphotyrosin-haltigen Liganden für die N-SH2-Domäne von SHP-1 gezeigt werden [46, 176, 177]. Es war jedoch in dieser Arbeit notwendig, die Zyklisierung zu wiederholen, um die Kopplungsausbeuten zu erhöhen. Trotz der erfolgreichen Synthese des vorgeschlagenen Liganden konnten im Rohprodukt eine Reihe von Nebenprodukten detektiert werden (Abb. 32A). Deshalb bedarf es einer Optimierung

einzelner Reaktionsschritte, u.a. der Alloc-/OAll-Abspaltung und der Zyklisierung, um den Liganden in ausreichender Menge für die enzymatische Testung zur Verfügung zu stellen.

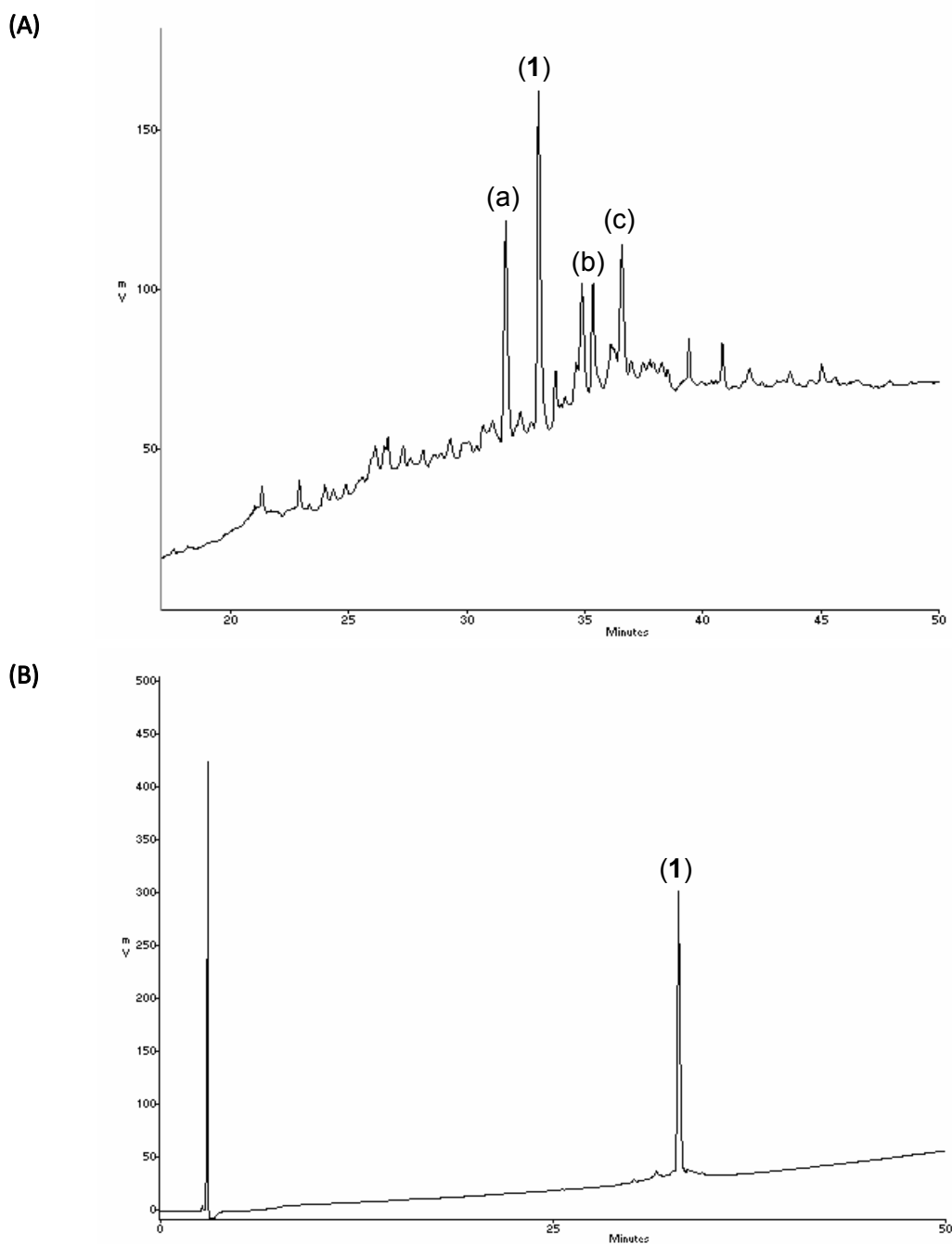


Abb. 32 HPLC Analysen...
 (A) des unter Durchführung von Strategie D (Abb. 29) erhaltenen Rohproduktes (a) N-Rückgrat-Seitenketten-zyklisierter Liganden, (b) monoallyl-geschütztes und (c) diallyl-geschütztes Nebenprodukt.
 (B) des unter Durchführung von Strategie D (Abb. 29) erhaltenen N-Rückgrat-Seitenketten-zyklisierten Liganden
 Gradient: 10–60% Eluent B in 50 min mit Eluent A: 0,1% TFA in Wasser und B: 0,1% TFA in Acetonitril, Flussrate: 1 ml/min, 220 nm.

Abschließend sind in Tabelle 10 die Ergebnisse der analytischen Charakterisierung der synthetisierten Blöcke und Peptide dargestellt. Dabei erfolgte die Charakterisierung mittels MALDI-MS, HPLC und Dünnschichtchromatographie.

Tabelle 10: Charakterisierung der synthetisierten Blöcke und Peptide.

Peptid	Sequenz	M _w [g/mol]		t _R [min]	R _{f1} [e]	R _{f2} [f]	R _{f3} [g]
		theor.	gefund.				
11	Fmoc-N[(CH ₂) ₃ NHAlloc]Tyr-OH		545,0 ^[a]	31,06 ^[c]	0,64	0,89	-
12	Fmoc-N[(CH ₂) ₃ NHAlloc]Tyr(PO ₃ Bu ^t) ₂ -OH		737,0 ^[a]	44,37 ^[c]	0,54	-	-
13	Fmoc-N[(CH ₂) ₃ NHAlloc]Tyr(PO ₃ H ₂)-OH		647,1 ^[a]	21,90 ^[c]	0,19	-	-
14	EGLNcΨ[CON((CH ₂) ₃ NH)pYNIeE(NHCH ₂ CO)]L-NH ₂		1147,5 ^[b]	33,05 ^[d]	-	-	0,54
15	LNpYML-NH ₂		722,9 ^[a]	20,58 ^[d]	-	-	0,63
16	LNpYML-NH ₂		801,8 ^[a]	16,38 ^[d]	-	-	0,45

^[a] [M+H]⁺, ^[b] [M+Na]⁺; ^[c] 20-80% Eluent B in 60 min, ^[d] 10-60% Eluent B in 50 min
 (Eluent A: 0,1% TFA/Wasser, Eluent B: 0,1% TFA/Acetonitril; Flussrate: 1 ml/min; λ=220 nm);
^[e] System 1: Chloroform:Methanol (9:1); ^[f] System 2: n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:1);
^[g] System 3: n-Butanol:Eisessig:Wasser (48:18:24).

6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

In der vorliegenden Arbeit ist die Synthese von mono- und bivalenten Phosphopeptidliganden sowie deren biologische Testung beschrieben. Dabei stand die Evaluierung der Liganden, die von Ros pY²²⁶⁷ (EGLNpY²²⁶⁷-NH₂) abgeleitet sind, hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Aktivität der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 zu beeinflussen sowie deren Assoziation mit der N-SH2-Domäne von SHP-1 (monovalente Liganden) und zusätzlich mit einer unabhängigen Bindungsstelle in der Nähe der SHP-1 N-SH2/PTP-Kontaktfläche (bivalente Liganden) im Mittelpunkt.

Im Vergleich zu zyklischen Verbindungen vorangegangener Serien zeigten theoretische Betrachtungen, dass auch eine C-terminale Verschiebung der Ringstruktur, insbesondere in die Position des Phosphotyrosinrestes, einen positiven Einfluss auf das Bindungsverhalten besitzen könnte. Dies führte zur Generierung eines monovalenten N-Rückgrat-Seitenketten-zyklisierten Liganden EGLNcΨ[CON((CH₂)₃NH)pYNleE(NHCH₂CO)]L-NH₂, dessen synthetischer Zugang im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit beschrieben ist.

- 1) Die Darstellung der Phosphopeptidliganden (**1-10**), die entsprechend ihrer Konstitution entweder an die N-SH2- oder an die N-SH2- und PTP-Domäne assoziieren sollten, gelang erfolgreich nach literaturbekannten Methoden. Die Peptide wurden in ihrer N-terminal freien (Phosphatase-Aktivitätstest) sowie biotinylierten (Bindungsstudien) Form hergestellt.
- 2) Die Fähigkeit der synthetisierten N-SH2 Liganden (**1**) bis (**10**), die Phosphataseaktivität zu stimulieren bzw. zu inhibieren, erfolgte unter physiologischen Konditionen (pH 7,4) in einem Phosphatase-Aktivitätstest. Als Substrat wurde *p*-Nitrophenylphosphat verwendet. Die ermittelten Aktivitäten wurden relativ zur Leitstruktur Ros pY²²⁶⁷ (**1**) angegeben. Grundsätzlich lassen sich danach die Phosphopeptidliganden in 3 Gruppen einteilen.

- I) Effektoren, die in Abhängigkeit ihrer Konzentration die Phosphataseaktivität stärker aktivieren (2, 3),
- II) Liganden mit ähnlichem Aktivierungsverhalten wie die Leitstruktur (1) (4, 5, 7, 9, 10) und
- III) Liganden mit inhibitorischen Eigenschaften (6, 8)

Die Phosphopeptide (2) und (3) aktivieren SHP-1 in Abhängigkeit ihrer Konzentration. Während Ligand (3) die Phosphatase verzögert aktiviert, konnte für Peptid (2) die SHP-1 Aktivierung nur bis 100 μ M beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die in den Positionen pY-4 bis pY+6 strukturell ähnlichen Peptide (2) und (9) bzw. (3) und (10) ein unterschiedliches Aktivierungsprofil aufzeigen. Die Zyklisierung der Liganden (7), (9) und (10) resultierte in einem der Leitsequenz (1) vergleichbaren Aktivierungsverhalten. Dies bedeutet, dass im Fall dieser Liganden weder die Ringgröße noch die Ringposition einen Einfluss auf die Aktivierung von SHP-1 haben.

- 3) Die durchgeführten Bindungsstudien konnten die Resultate des Phosphatase-Aktivitätstests für die linearen Liganden (4) bis (6) bekräftigen. Dabei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen strukturellen Unterschieden innerhalb des N-Terminus und den ermittelten Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Beispielsweise zeigt Ligand (6) keine Assoziation mit der SHP-1 N-SH2-Domäne. Von besonderem Interesse war dabei das Ergebnis, dass die N-terminale Sequenzverkürzung um die Reste pY-2 und pY-1, durch die C-terminale Sequenzverlängerung (pY+4 und pY+5) im Fall von Peptid (6) nicht kompensiert wird. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Position pY-2 für die Erkennung von Liganden durch die N-SH2-Domäne von SHP-1.

In Korrelation zu den Aktivierungspotentialen der zyklischen Liganden (7), (9) und (10) konnten im Vergleich zu Ligand (1) höhere Bindungsaffinitäten zur N-SH2-

Domäne von SHP-1 bestimmt werden. Mit dem zyklischen Liganden (**8**) konnte ein Effektor mit inhibitorischer Wirkung dargestellt werden, denn das über die Reste pY+1 und pY+3 zyklisierte Peptid stellte sich als hochaffiner Bindungspartner heraus.

- 4) In der Literatur wurden 2 Bindungsmodi für die Assoziation von Phosphopeptidliganden an die N-SH2-Domäne von SHP-1 anhand eines Modells vorgeschlagen. Dabei beschreibt der Bindungsmodus II die Bindung des Liganden in einer gestreckten Konformation, die zur Aktivierung von SHP-1 führt. Weiterhin ist die Bindung in gekrümmter Konformation für Peptide der Konsensussequenzklasse I (Modus I) beschrieben. Im Vergleich zu Modus II führt Modus I zu einer schlechteren Aktivierung von SHP-1. Durch Dockingexperimente konnte für fast alle hier beschriebenen SHP-1 Aktivatoren der Bindungsmodus II identifiziert werden. Dem inhibitorischen Liganden (**8**) konnte der Bindungsmodus I zugeordnet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit dem beschriebenen Model der Bindungsmodi überein.

Mit dem bivalenten, zyklischen Liganden (**8**), EGLNpYc[KVD]NleFPAPEEEE-NH₂, konnte ein im Vergleich zur Leitstruktur Ros pY²²⁶⁷ hochaffiner Inhibitor der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 dargestellt werden. Dadurch ist es in nachfolgenden Untersuchungen mit davon abgeleiteten strukturoptimierten Verbindungen möglich, den Aktivierungsmechanismus genauer zu charakterisieren. Weiterhin kann der Einfluss von SHP-1 in einer Reihe von Signalwegen mit Hilfe solcher Peptide untersucht werden.

Für die Darstellung des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Peptides wurden verschiedene Synthesestrategien erprobt, da der synthetische Zugang zu rückgratzyklischen Phosphopeptiden bisher unbekannt war. Es wurden Strategien der postsynthetischen Phosphorylierung und *building block* Methoden getestet und miteinander verglichen.

- 1) In einem ersten Schritt erfolgte die Einführung der Phosphatgruppe in eine Modellsequenz (LNYMVL-NH₂) durch Phosphorylierung an der festen Phase bzw. in Lösung unter Verwendung der Phosphoamidite (Et)₂NP[O^tBzl]₂ und (Et)₂NP[O^tBu]₂. Aufgrund der verringerten Anzahl an Syntheseschritten und der verkürzten Abspaltungs-

zeiten wurde für die Generierung des N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden die Phosphorylierung an der festen Phase unter Verwendung von $(\text{Et})_2\text{NP}[\text{O}^t\text{Bu}]_2$ und 1*H*-Tetrazol bevorzugt.

- 2) Parallel wurde der Einbau des *building blocks* N-(Alloc-aminopropyl)-Tyrosin in phosphorylierter bzw. unphosphorylierter Form in die Peptidsequenz untersucht. Die Darstellung des phosphorylierten Bausteins konnte dabei durch temporäre Silylierung und anschließender Phosphorylierung erfolgreich durchgeführt werden.
- 3) Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente konnten verschiedene Synthesestrategien zur Darstellung der N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden abgeleitet werden.
 - (A) Peptidsynthese an der festen Phase - Zyklisierung - Phosphorylierung
 - (B) Peptidsynthese an der festen Phase - Phosphorylierung - Zyklisierung
 - (C) Peptidsynthese an der festen Phase bis zum N-(Alloc-aminopropyl)-Tyrosin – Phosphorylierung - Sequenzverlängerung - Zyklisierung
 - (D) Peptidsynthese an der festen Phase unter Verwendung des Phosphat-ungeschützten N-(Alloc-aminopropyl)-Phosphotyrosins – Zyklisierung

Während Strategie C zur Sequenzterminierung während der Synthese aufgrund sterischer Hinderungen führte, konnte unter Anwendung der Strategien A, B und D der gewünschte Phosphopeptidligand synthetisiert werden. Damit konnten erstmals Strategien zur Darstellung eines N-Rückgrat-Seitenketten-zyklischen Liganden erfolgreich durchgeführt und vorgestellt werden. Diverse Reaktionschritte, wie z.B. Alloc/OAll-Abspaltung und Zyklisierung, erfordern perspektivisch eine weitere Optimierung zur Verbesserung der Ausbeute an gewünschtem Produkt.

Mit der Synthese des Peptides $\text{EGLNc}\Psi[\text{CON}((\text{CH}_2)_3\text{NH})\text{pYNleE}(\text{NHCH}_2\text{CO})]\text{L-NH}_2$ ist erstmals erfolgreich ein N-Rückgrat-Seitenketten-zyklisches Phosphopeptid generiert worden. Die vorhergesagte Erhöhung der Bindungsaffinität des Liganden gegenüber der SHP-1 N-

SH2-Domäne sowie der inhibitorische Einfluss auf die SHP-1 Aktivität gilt es in nachfolgenden Untersuchungen zu klären.

The crystal structure of the full-length SHP-1 in complex with a ligand has not been reported yet, since binding to the N-terminal SH2 domain leads to activation of the phosphatase caused by dissociation of the autoinhibitory PTP-N-SH2 complex. Thus, the structure of an enzyme-ligand-complex is still elusive to date. However, this structure may reveal interesting features with respect to the conformational changes upon binding of a ligand in comparison to the non-complexed protein structure. In turn, such investigations may represent a step toward the better understanding of the structure-function-relationship of SHP-1 and moreover, may assist in the design of selective N-SH2 inhibitors rather than PTP inhibitors that bind to the active site in the enzyme's open conformation. In the present study a new series of linear and cyclic phosphopeptide ligands for the SHP-1 N-SH2 domain derived from lead peptide Ros pY²²⁶⁷ was examined. One peptide (**8**) exhibited the strongest inhibitory activity at marginally improved binding affinity. That is due to the difficulty of distinguishing between the different binding modes leading, depending on the occupation of the gap for residue pY+3, to SHP-1 activation or inhibition. Further optimization of the motifs corresponding to pockets on the SH2- as well as the PTP-domain and that of the linker would lead to more potent inhibitors. However, the peptide (**8**) may serve as a good candidate for the further design of potential bivalent antagonists of SHP-1 N-SH2 with the aim to develop a compound that is able to prevent the PTP-N-SH2 dissociation process and thus, facilitates structural analysis of the enzyme in complex with a high-affinity binding partner. [**]

The second part of this study, the backbone-side chain cyclic peptide EGLNcΨ[CON((CH₂)₃NH)pYNleE(NHCH₂CO)]L-NH₂ has been prepared according to different synthetic ways including the post-assembly phosphorylation as well as a building block approach. The latter required the availability of Fmoc-N-aminopropylphosphotyrosine that was successfully obtained by phosphorylation of the nonphosphorylated precursor amino acid using dialkyl-*N,N*-diethylphosphoramidites following temporary *tert*-butyldimethylsilyl protection of the starting compound. Coupling of this building unit to the resin-bound peptide and coupling of the subsequent amino acid (Asn)

to N-aminopropyl-phosphotyrosine was demonstrated to proceed most efficiently if using TFFH as the coupling reagent. In contrast, the acylation of the phosphate-diprotected N-aminopropyl-phosphotyrosine was not at all possible for obvious sterical hindrance through the additional protecting groups. However, further work dealing with the optimization of the successful strategies, e.g. optimization of the cleavage of allyl-type protecting groups and the cyclization reaction, are currently in progress. [***]

[**] **Teichmann, K.**, Kühl, T., König, I., Wieligmann, K., Zacharias, M., Imhof, D., Modulation of SHP-1 phosphatase activity by mono- and bivalent SH2 phosphopeptide ligands, (2009) *Biopolymers*, submitted.

[***] **Teichmann, K.**, Niksch, T., Wieligmann, K., Zacharias, M., Imhof, D., Synthetic strategies to a backbone-side chain cyclic SHP-1 N-SH2 ligand containing N-functionalized alkyl phosphotyrosine, (2009) *Protein Pept. Lett.*, submitted.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Newsletter 1984, (1984) *Eur. J. Biochem.* 138, 5-7.
- 2 Jones, J. H., Abbreviations and symbols in peptide science: a revised guide and commentary, (2006) *J. Pept. Sci.* 12, 1-12.
- 3 Hunter, T., Signaling-2000 and Beyond, (2000) *Cell* 100, 113-127.
- 4 Klumpp, S., Thissen, M. C., Krieglstein, J., Protein phosphatases types 2C α and 2C β in apoptosis, (2006) *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1370-1375.
- 5 Stoker, A. W., Protein tyrosine phosphatases and signalling, (2005) *J Endocrinol* 185, 19-33.
- 6 Zhang, J., Somani, A. K., Siminovitch, K.A., Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling, (2000) *Semin. Immunol.* 12, 361-378.
- 7 Cohen, P., The regulation of protein function by multisite phosphorylation-a 25 year update, (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25, 596-601.
- 8 Hunter, T., Cooper, J. A., Protein-tyrosine kinases, (1985) *Annu Rev Biochem* 54, 897-930.
- 9 Zhang, Z. Y., Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development, (2002) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 209-234.
- 10 Cohen, P. T., Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life, (1997) *Trends Biochem. Sci.* 22, 245-251.
- 11 Huang, X., Honkanen, R. E., Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to Drosophila retinal degeneration C gene product (rdgC), (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 1462-1468.
- 12 Tonks, N. K., Diltz, C. D., Fischer, E. H., Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta, (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6722-6730.
- 13 Charbonneau, H., Tonks, N. K., Kumar, S., Diltz, C. D., Harrylock, M., Cool, D. E., Krebs, E. G. Fischer, E. H., Walsh, K. A., Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins, (1989) *Proc. Nat./ Acad. Sci.* 86, 5252-5256.

- 14 Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T., Protein tyrosine phosphatases in the human genome., (2004) *Cell* 117, 699-711.
- 15 Zhang, Z. Y., Dixon, J. E., Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity, (1994) *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 68, 1-36.
- 16 Musharraf, A., Marksches, N., Teichmann, K., Pankratz, S., Landgraf, K., Englert, C., Imhof, D., Eyes absent proteins: characterization of substrate specificity and phosphatase activity of mutants associated with branchial, otic and renal anomalies, (2008) *Chembiochem.* 9, 2285-94.
- 17 Rayapureddi, J. P., Kattamuri, C., Chan, F. H., Hegde, R. S., Characterization of a plant, tyrosine-specific phosphatase of the aspartyl class, (2005) *Biochemistry* 44, 751-758.
- 18 Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K., Møller, N. P., Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains, (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21, 7117-7136.
- 19 Zhang, Z., Shen, K., Lu, W., Cole, P. A., The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 4668-4674.
- 20 Rayapureddi, J. P., Kattamuri, C., Steinmetz, B. D., Frankfort, B. J., Ostrin, E. J., Mardon, G., Hegde, R. S., Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases, (2003) *Nature* 426, 295-298.
- 21 Ducruet, A. P., Vogt, A., Wipf, P., Lazo, J. S., Dual specificity protein phosphatases: therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease, (2005) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 725-750.
- 22 Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P., Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart, (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 941-949.
- 23 Honda, R., Ohba, Y., Nagata, A., Okayama, H., Yasuda, H., Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase, (1993) *FEBS Lett.* 318, 331-334.
- 24 Burke, T. R. Jr., Zhang, Z. Y., Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery, (1998) *Biopolymers* 47, 225-241.
- 25 Li, L., Dixon, J. E., Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases, (2000) *Semin. Immunol.* 12, 75-84.

- 26 Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J., Tonks, N. K., Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B, (1995) *Science* 268, 1754-1758.
- 27 Yuvaniyama, J., Denu, J. M., Dixon, J. E., Saper, M. A., Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR, (1996) *Science* 272, 1328-1331.
- 28 Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W., Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 6516-6520.
- 29 Frearson, J. A., Alexander, D. R., The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction, (1997), *Bioessays* 19, 417-427.
- 30 Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M. J., Shoelson, S. E., Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2, (1998) *Cell* 92, 441-450.
- 31 Andersen, J. N., Jansen, P. G., Echwald, S. M., Mortensen, O.H., Fukada, T., Del Vecchio, R., Tonks, N. K., Møller, N. P., A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage, (2004) *FASEB J.* 18, 8-30.
- 32 Plutzky, J., Neel, B. G., Rosenberg, R. D., Eddy, R. L., Byers, M. G., Jani-Sait, S., Shows, T. B., (1992) *Genomics* 13, 869-872.
- 33 Banville, D., Stocco, R., Shen, S. H., Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts, (1995) *Genomics* 27, 165-173.
- 34 Shen, S. H., Bastien, L., Posner, B. I., Chrétien, P., A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases, (1991) *Nature* 352, 736-739.
- 35 Plutzky, J., Neel, B. G., Rosenberg, R.D., Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1123-1127.
- 36 Tsui, H. W., Hasselblatt, K., Martin, A., Mok, S. C., Tsui, F. W., Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression, (2002) *Eur. J. Biochem.* 269, 3057-3064.
- 37 Martin, A., Tsui, H. W., Tsui, F.W., SHP-1 variant proteins are absent in motheaten mice despite presence of splice variant transcripts with open reading frames, (1999) *Mol. Immunol.* 36, 1029-1041.

- 38 Yang, J., Cheng, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W., Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4066-4071.
- 39 Wieligmann, K., Pineda De Castro, L. F., Zacharias, M., Molecular dynamics simulations on the free and complexed N-terminal SH2 domain of SHP-2, (2002) *In Silico Biol.* 2, 305-311.
- 40 Yang, J., Liang, X., Niu, T., Meng, W., Zhao, Z., Zhou, G. W., Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 28199-28207.
- 41 Yang, J., Cheng, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W., Protein tyrosine phosphatase SHP-1 specifically recognizes C-terminal residues of its substrates via helix alpha0, (2001) *J. Cell. Biochem.* 83, 14-20.
- 42 Pei, D., Neel, B. G., Walsh, C.T., Overexpression, purification, and characterization of SHPTP1, a Src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1092-1096.
- 43 Zhao, Z., Bouchard, P., Diltz, C. D., Shen, S. H., Fischer, E. H., Purification and characterization of a protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains, (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 2816-2820.
- 44 Pei, D., Lorenz, U., Klingmüller, U., Neel, B. G., Walsh, C.T., Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains, (1994) *Biochemistry* 33, 15483-15493.
- 45 Pei, D., Wang, J., Walsh, C. T., Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,, 1141-1145.
- 46 Hampel, K., Kaufhold, I., Zacharias, M., Böhmer, F. D., Imhof, D., Phosphopeptide ligands of the SHP-1 N-SH2 domain: effects on binding and stimulation of phosphatase activity, (2006) *ChemMedChem* 1, 869-877.
- 47 Blery, M., Vivier, E., How to extinguish lymphocyte activation, immunotyrosine-based inhibition motif (ITIM)-bearing molecules a solution?, (1999) *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 187-191.
- 48 Vély, F., Vivier, E., Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts, (1997) *J. Immunol.* 159, 2075-2077.

- 49 Unkeless, J. C., Jin, J., Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases, (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9, 338-343.
- 50 Vivier, E., Daëron, M., Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs, (1997) *Immunol. Today* 18, 286-291.
- 51 Pluskey, S., Wandless, T. J., Walsh, C. T., Shoelson, S. E., Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 2897-2900.
- 52 Sugimoto, S., Wandless, T. J., Shoelson, S. E., Neel, B. G., Walsh, C. T., Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1, (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13614-13622.
- 53 Tenev, T., Keilhack, H., Tomic, S., Stoyanov, B., Stein-Gerlach, M., Lammers, R., Krivtsov, A. V., Ullrich, A., Böhmer, F. D., Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 5966-5973.
- 54 Dechert, U., Affolter, M., Harder, K. W., Matthews, J., Owen, P., Clark-Lewis, I., Thomas, M. L., Aebersold, R., Jirik, F. R., Comparison of the specificity of bacterially expressed cytoplasmic protein-tyrosine phosphatases SHP and SH-PTP2 towards synthetic phosphopeptide substrates, (1995) *Eur. J. Biochem.* 231, 673-681.
- 55 Poole, A. W., Jones, M. L., A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail, (2005) *Cell. Signal.* 17, 1323-1332.
- 56 Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Pei, D., Walsh, C. T., Burakoff, S. J., Neel, B. G., Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells, (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 1824-1834.
- 57 Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C., Kasuga, M., Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains, (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 12220-12228.
- 58 Bouchard, P., Zhao, Z., Banville, D., Dumas, F., Fischer, E. H., Shen, S. H., Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C, (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19585-19589.

- 59 Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschörnig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M., Böhmer, F. D., Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1, (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 11375-11383.
- 60 He, H. T., Lellouch, A., Marguet, D., Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signalling, (2005) *Semin. Immunol.* 17, 23-33.
- 61 Fawcett, V. C., Lorenz, U., Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus, (2005) *J. Immunol.* 174, 2849-2859.
- 62 Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschörnig, O., Böhmer, F. D., Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation, (1999) *Biochemistry* 38, 11993-12002.
- 63 Zhang, Z. Y., Thieme-Sefler, A. M., Maclean, D., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., Sawyer, T. K., Dixon, J. E., Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4446-4450.
- 64 Zhang, Z. Y., Maclean, D., McNamara, D. J., Sawyer, T. K., Dixon, J. E., Protein tyrosine phosphatase substrate specificity: size and phosphotyrosine positioning requirements in peptide substrates, *Biochemistry* 33, 2285-2290.
- 65 Wang, P., Fu, H., Snavley, D. F., Freitas, M. A., Pei, D., Screening combinatorial libraries by mass spectrometry. 2. Identification of optimal substrates of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2002) *Biochemistry* 41, 6202-6210.
- 66 Teichmann, K., Winkler, R., Hampel, K., Trümpler, A., Böhmer, F. D., Imhof, D., Monitoring phosphatase reactions of multiple phosphorylated substrates by reversed-phase HPLC, (2007) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 853, 204-213.
- 67 Green, M. C., Shultz, L.D., Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology, (1975) *J. Hered.* 66, 250-258.
- 68 Tsui, H. W., Siminovitch, K.A., de Souza, L., Tsui, F. W., Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene, (1993) *Nat. Genet.* 4, 124-129.
- 69 Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Rajan, T. V., Yi, T., Ihle, J. N., Matthews, R. J., Thomas, M. L., Beier, D. R., Mutations at the murine motheaten locus are within the haematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene, (1993) *Cell* 73, 1445-1454.

- 70 Kruger, J., Butler, J. R., Cherapanov, V., Dong, Q., Ginzberg, H., Govindarajan, A., Grinstein, S., Siminovitch, K. A., Downey, G. P., Deficiency of Src homology 2-containing phosphatase 1 results in abnormalities in murine neutrophil function: studies in motheaten mice, (2000) *J. Immunol.* 165, 5847-5859.
- 71 Kozlowski, M., Mlinaric-Rascan, I., Feng, G. S., Shen, R., Pawson, T., Siminovitch, K.A., Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice, (1993) *J. Exp. Med.* 178, 2157-2163.
- 72 Bignon, J. S., Siminovitch, K.A., Identification of PTP1C mutation as the genetic defect in motheaten and viable motheaten mice: a step toward defining the roles of protein tyrosine phosphatases in the regulation of hemopoietic cell differentiation and function, (1994) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73, 168-179.
- 73 Downey, G. P., Fukushima, T., Fialkow, L., Waddell, T. K., Intracellular signaling in neutrophil priming and activation, (1995) *Semin. Cell. Biol.* 6, 345-356.
- 74 Ptasznik, A., Prossnitz, E. R., Yoshikawa, D., Smrcka, A., Traynor-Kaplan, A. E., Bokoch, G. M., A tyrosine kinase signaling pathway accounts for the majority of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate formation in chemoattractant-stimulated human neutrophils, (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 25204-25207.
- 75 Berton, G., Fumagalli, L., Laudanna, C., Sorio, C., Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils, (1994) *J. Cell. Biol.* 126, 1111-1121.
- 76 Corey, S., Eguinoa, A., Puyana-Theall, K., Bolen, J. B., Cantley, L., Mollinedo, F., Jackson, T. R., Hawkins, P. T., Stephens, L. R., Granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulates both association and activation of phosphoinositide 3OH-kinase and src-related tyrosine kinase(s) in human myeloid derived cells, (1993) *EMBO J.* 12, 2681-2690.
- 77 Asahi, M., Taniguchi, T., Hashimoto, E., Inazu, T., Maeda, H., Yamamura, H., Activation of protein-tyrosine kinase p72syk with concanavalin A in polymorphonuclear neutrophils, (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 23334-23338.
- 78 Dong, Q., Siminovitch, K. A., Fialkow, L., Fukushima, T., Downey, G. P., Negative regulation of myeloid cell proliferation and function by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase-1, (1999) *J. Immunol.* 162, 3220-3230.
- 79 Roach, T. I., Slater, S. E., White, L.S., Zhang, X., Majerus, P. W., Brown, E. J., Thomas, M. L., The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates integrin-mediated adhesion of macrophages, (1998) *Curr. Biol.* 8, 1035-1038.

- 80 Yi, T., Ihle, J. N., Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand, (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 3350-3358.
- 81 Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D. M., Rottapel, R., Siminovitch, K. A., SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain, (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 2089-2099.
- 82 Jiao, H., Yang, W., Berrada, K., Tabrizi, M., Shultz, L., Yi, T., Macrophages from mot-heaten and viable motheaten mutant mice show increased proliferative responses to GM-CSF: detection of potential HCP substrates in GM-CSF signal transduction, (1997) *Exp. Hematol.* 25, 592-600.
- 83 Chen, H. E., Chang, S., Trub, T., Neel, B. G., Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1, (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 3685-3697.
- 84 Yi, T., Mui, A. L., Krystal, G., Ihle, J. N., Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis, (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 7577-7586.
- 85 Wheadon, H., Paling, N. R., Welham, M.J., Molecular interactions of SHP1 and SHP2 in IL-3-signalling, (2002) *Cell. Signal.* 14, 219-229.
- 86 Fanger, N.A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S. C., Maliszewski, C. R., Borges, L., The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signalling in monocytes, (1998) *Eur. J. Immunol.* 28, 3423-3434.
- 87 Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., Hsu, M. L., A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules, (1997) *Immunity.* 7, 273-282.
- 88 Timms, J.F., Carlberg, K., Gu, H., Chen, H., Kamatkar, S., Nadler, M. J., Rohrschneider, L. R., Neel, B. G., Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages, (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 3838-3850.
- 89 Bléry, M., Kubagawa, H., Chen, C. C., Vély, F., Cooper, M. D., Vivier, E., The paired Ig-like receptor PIR-B is an inhibitory receptor that recruits the protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 2446-2451.
- 90 Kubagawa, H., Burrows, P. D., Cooper, M. D., A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5261-5266.

- 91 Ward, A. C., Oomen, S. P., Smith, L., Gits, J., van Leeuwen, D., Soede-Bobok, A. A., Erpelinck-Verschueren, C. A., Yi, T., Touw, I.P., The SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 is induced by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and modulates signaling from the G-CSF receptor, (2000) *Leukemia* 14, 1284-1291.
- 92 Villunger, A., O'Reilly, L. A., Holler, N., Adams, J., Strasser, A., Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes, (2000) *J. Exp. Med.* 192, 647-657.
- 93 Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D. R., Simon, H. U., Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils, (2002) *Nat. Med.* 8, 61-67.
- 94 Yousefi, S., Simon, H. U., SHP-1: a regulator of neutrophil apoptosis, (2003) *Semin. Immunol.* 15, 195-199.
- 95 Yetter, A., Uddin, S., Krolewski, J. J., Jiao, H., Yi, T., Platanias, L. C., Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 18179-18182.
- 96 Kon-Kozlowski, M., Pani, G., Pawson, T., Siminovitch, K. A., The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells, (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3856-3862.
- 97 Wei, S., Liu, J. H., Epling-Burnette, P. K., Gamero, A. M., Ussery, D., Pearson, E. W., Elkabani, M. E., Diaz, J. I., Djeu, J.Y., Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, (1996) *J. Immunol.* 157, 5155-5162.
- 98 Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G., Lodish, H. F., Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals, (1995) *Cell* 80, 729-738.
- 99 Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Platanias, L. C., Yi, T., Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1, (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 6985-6992.
- 100 Cheng, A. M., Negishi, I., Anderson, S. J., Chan, A. C., Bolen, J., Loh, D. Y., Pawson, T., The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signalling, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9797-9801.

- 101 Isakov, N., Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades, (1997) *J. Leukoc. Biol.* 61, 6-16.
- 102 Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., Reth, M., SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation, (1998) *J. Exp. Med.* 188, 791-795.
- 103 Siminovitch, K. A., Neel, B. G., Regulation of B cell signal transduction by SH2-containing protein-tyrosine phosphatases, (1998) *Semin. Immunol.* 10, 329-347.
- 104 Pani, G., Kozlowski, M., Cambier, J. C., Mills, G. B., Siminovitch, K. A., Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling, (1995) *J. Exp. Med.* 181, 2077-2084.
- 105 Wu, Y., Pani, G., Siminovitch, K., Hozumi, N., Antigen receptor-triggered apoptosis in immature B cell lines is associated with the binding of a 44-kDa phosphoprotein to the PTP1C tyrosine phosphatase, (1995) *Eur. J. Immunol.* 25, 2279-2284.
- 106 Wu, Y., Nadler, M. J., Brennan, L. A., Gish, G. D., Timms, J. F., Fusaki, N., Jongstra-Bilen, J., Tada, N., Pawson, T., Wither, J., Neel, B. G., Hozumi, N., The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1, (1998) *Curr. Biol.* 8, 1009-1017.
- 107 Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yanagi, S., Kurosaki, T., Ravetch, J. V., Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signalling, (1997) *Cell* 90, 293-301.
- 108 Bolland, S., Ravetch, J. V., Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors, (1999) *Adv. Immunol.* 72, 149-177.
- 109 Cambier, J. C., Inhibitory receptors abound?, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5993-5995.
- 110 Thomas, M. L., Of ITAMs and ITIMs: turning on and off the B cell antigen receptor, (1995) *J. Exp. Med.* 181, 1953-1956.
- 111 Long, E.O., Regulation of immune responses by inhibitory receptors, (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 452, 19-28.
- 112 Plas, D. R., Williams, C. B., Kersh, G. J., White, L. S., White, J. M., Paust, S., Ulyanova, T., Allen, P. M., Thomas, M. L., Cutting edge: the tyrosine phosphatase SHP-1 regulates thymocyte positive selection, (1999) *J. Immunol.* 162, 5680-5684.

- 113 Pani, G., Fischer, K. D., Mlinaric-Rascan, I., Siminovitch, K.A., Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase, (1996) *J. Exp. Med.* 184, 839-852.
- 114 Mingari, M. C., Moretta, A., Moretta, L., Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses, (1998) *Immunol. Today* 19, 153-157.
- 115 Carretero, M., Calmieri, G., Llano, M., Tullio, V., Santoni, A., Geraghty, D. E., López-Botet, M., Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants, (1998) *Eur. J. Immunol.* 28, 1280-1291.
- 116 Le Dréan, E., Vély, F., Olcese, L., Cambiaggi, A., Guia, S., Krystal, G., Gervois, N., Moretta, A., Jotereau, F., Vivier, E., Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases, (1998) *Eur. J. Immunol.* 28, 264-276.
- 117 Dupont, B., Selvakumar, A., Steffens, U., The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4, (1997) *Tissue Antigens.* 49, 557-563.
- 118 Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Burakoff, S. J., Neel, B. G., Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9624-9629.
- 119 Clements, J. L., Yang, B., Ross-Barta, S. E., Eliason, S. L., Hrstka, R. F., Williamson, R. A., Koretzky, G. A., Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development, (1998) *Science* 281, 416-419.
- 120 Henshall, T. L., Jones, K. L., Wilkinson, R., Jackson, D. E., Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, are required for platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD31-mediated inhibitory signaling, (2001) *J. Immunol.* 166, 3098-3106.
- 121 Migone, T. S., Cacalano, N. A., Taylor, N., Yi, T., Waldmann, T. A., Johnston, J. A., Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3845-3850.
- 122 Keilhack, H., Müller, M., Böhmer, S. A., Frank, C., Weidner, K. M., Birchmeier, W., Ligensa, T., Berndt, A., Kosmehl, H., Günther, B., Müller, T., Birchmeier, C., Böhmer, F.D., Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling. An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2001) *J. Cell. Biol.* 152, 325-334.

- 123 Biskup, C., Böhmer, A., Pusch, R., Kelbauskas, L., Gorshokov, A., Majoul, I., Lindenau, J., Benndorf, K., Böhmer, F. D., Visualization of SHP-1-target interaction, (2004) *J. Cell. Sci.* 117, 5165-5178.
- 124 Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitonov, A., Imyanitov, E., Ullrich, A., Böhmer, F. D., Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 21277-21284.
- 125 Keilhack, H., Tenev, T., Nyakatura, E., Godovac-Zimmermann, J., Nielsen, L., Seedorf, K., Böhmer, F.D., Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 24839-24846.
- 126 Keilhack, H., Hellman, U., van Hengel, J., van Roy, F., Godovac-Zimmermann, J., Böhmer, F. D., The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26376-26384.
- 127 Tenev, T., Böhmer, S. A., Kaufmann, R., Frese, S., Bittorf, T., Beckers, T., Böhmer, F. D., Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells, (2000) *Eur. J. Cell. Biol.* 79, 261-271.
- 128 Craggs, G., Kellie, S., A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 23719-23725.
- 129 Duchesne, C., Charland, S., Asselin, C., Nahmias, C., Rivard, N., Negative regulation of beta-catenin signaling by tyrosine phosphatase SHP-1 in intestinal epithelial cells, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 14274-14283.
- 130 Sadowski, I., Stone, J. C., Pawson, T., A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps, (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 4396-4408.
- 131 Liu, B. A., Jablonowski, K., Raina, M., Arce, M., Pawson, T., Nash, P. D., The human and mouse complement of SH2 domain proteins—establishing the boundaries of phosphotyrosine signalling, (2006) *Mol. Cell.* 22, 851–868.
- 132 Yaffe, M. B., Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction, (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 177-186.
- 133 Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D., Kuriyan, J., Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms, (1993) *Cell* 72, 779-790.

- 134 Kuriyan, J., Cowburn, D., Structures of SH2 and SH3 domains, (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 828-837.
- 135 Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S. C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R. B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B. J., Overduin, M., Resh, M. D., Rios, C. B., Silverman, L., Kuriyan, J., Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides, (1992) *Nature* 358, 646-653.
- 136 Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., Pawson, T., SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins, (1991) *Science* 252, 668-674.
- 137 Mayer, B. J., Baltimore, D., Signalling through SH2 and SH3 domains, (1993) *Trends Cell. Biol.* 3, 8-13.
- 138 Mayer, B. J., Jackson, P. K., Van Etten, R. A., Baltimore, D., Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo, (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 609-618.
- 139 Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., Cantley, L. C., SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences, (1993) *Cell* 72, 767-778.
- 140 Cantley, L. C., Songyang, Z., Specificity in recognition of phosphopeptides by src-homology 2 domains, (1994) *J. Cell. Sci. Suppl.* 18, 121-126.
- 141 Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnofsky, S., Feldman, R. A., Cantley, L. C., Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav, (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 2777-2785.
- 142 Huyer, G., Li, Z. M., Adam, M., Huckle, W. R., Ramachandran, C., Direct determination of the sequence recognition requirements of the SH2 domains of SH-PTP2, (1995) *Biochemistry* 34, 1040-1049.
- 143 Burshtyn, D. N., Yang, W., Yi, T., Long, E. O., A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 13066-13072.

- 144 Beebe, K. D., Wang, P., Arabaci, G., Pei, D., Determination of the binding specificity of the SH2 domains of protein tyrosine phosphatase SHP-1 through the screening of a combinatorial phosphotyrosyl peptide library, (2000) *Biochemistry* 39, 13251-13260.
- 145 Sweeney, M. C., Wavreille, A. S., Park, J., Butchar, J.P., Tridandapani, S., Pei. D., Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains, (2005) *Biochemistry* 44, 14932-14947.
- 146 Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A., Beauchemin, N., The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells, (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 335-344.
- 147 de Vet, E. C., Aguado, B., Campbell, R. D., G6b, a novel immunoglobulin superfamily member encoded in the human major histocompatibility complex, interacts with SHP-1 and SHP-2, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 42070-42076.
- 148 Lewis, J., Eiben, L. J., Nelson, D. L., Cohen, J. I., Nichols, K. E., Ochs, H. D., Notarangelo, L. D., Duckett, C. S., Distinct interactions of the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP with cytoplasmic domains of members of the CD2 receptor family, (2001) *Clin. Immunol.* 100, 15-23.
- 149 Howie, D., Simarro, M., Sayos, J., Guirado, M., Sancho, J., Terhorst, C., Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation, (2002) *Blood* 99, 957-965.
- 150 Tauchi, T., Damen, J. E., Toyama, K., Feng, G. S., Broxmeyer, H. E., Krystal, G., Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis, (1996) *Blood* 87, 4495-4501.
- 151 D'Ambrosio, D., Hippen, K. L., Minskoff, S. A., Mellman, I., Pani, G., Siminovitch, K. A., Cambier, J. C., Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1, (1995) *Science* 268, 293-297.
- 152 Famiglietti, S. J., Nakamura, K., Cambier, J. C., Unique features of SHIP, SHP-1 and SHP-2 binding to Fc gamma RIIB revealed by surface plasmon resonance analysis, (1999) *Immunol. Lett.* 68, 35-40.
- 153 Nakamura, K., Brauweiler, A., Cambier, J. C., Effects of Src homology domain 2 (SH2)-containing inositol phosphatase (SHIP), SH2-containing phosphotyrosine phosphatase (SHP)-1, and SHP-2 SH2 decoy proteins on Fc gamma RIIB1-effector interactions and inhibitory functions, (2000) *J. Immunol.* 164, 631-638.

- 154 Bruhns , P., Vely, F., Malbec, O., Fridman, W. H., Vivier, E., Daeron, M., Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 37357-37364.
- 155 Lesourne, R., Bruhns, P., Fridman, W. H., Daëron, M., Insufficient phosphorylation prevents fc gamma RIIB from recruiting the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 6327-6336.
- 156 Bone, H., Dechert, U., Jirik, F., Schrader, J. W., Welham, M. J., SHP1 and SHP2 protein-tyrosine phosphatases associate with betac after interleukin-3-induced receptor tyrosine phosphorylation. Identification of potential binding sites and substrates, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 14470-14476.
- 157 Haque, S. J., Harbor, P., Tabrizi, M., Yi, T., Williams, B. R., Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 33893-33896.
- 158 Cella, M., Döhning, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., Colonna, M., A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing, (1997) *J. Exp. Med.* 185, 1743-1751.
- 159 Cantoni, C., Bottino, C., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Castriconi, R., Vitale, M., Pende, D., Sivori, S., Millo, R., Biassoni, R., Moretta, L., Moretta, A., Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells, (1999) *Eur. J. Immunol.* 29, 3148-3159.
- 160 Burshtyn, D. N., Scharenberg, A. M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J. P., Long, E. O., Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor, (1996) *Immunity.* 4, 77-85.
- 161 Olcese, L., Lang, P., Vély, F., Cambiaggi, A., Marguet, D., Bléry, M., Hippen, K. L., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., Cambier, J. C., Vivier, E., Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases, (1996) *J. Immunol.* 156, 4531-4534.
- 162 Fry, A. M., Lanier, L. L., Weiss, A., Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C, (1996) *J. Exp. Med.* 184, 295-300.
- 163 Mousseau, D. D., Banville, D., L'Abbé, D., Bouchard, P., Shen, S. H., PILRalpha, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing protein, recruits SHP-1 upon tyrosine phosphorylation and is paired with the truncated counterpart PILRbeta (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4467-4474.

- 164 Fournier, N., Chalus, L., Durand, I., Garcia, E., Pin, J. J., Churakova, T., Patel, S., Zlot, C., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Bates, E. E., Garrone, P., FDF03, a novel inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is expressed by human dendritic and myeloid cells, (2000) *J. Immunol.* 165, 1197-1209.
- 165 Fujioka, Y., Matozaki, T., Noguchi, T., Iwamatsu, A., Yamao, T., Takahashi, N., Tsuda, M., Takada, T., Kasuga, M., A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion, *Mol. Cell. Biol.* 16, 6887-6899.
- 166 Veillette, A., Thibaudau, E., Latour, S., High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 22719-22728.
- 167 Huyer, G., Ramachandran, C., The specificity of the N-terminal SH2 domain of SHP-2 is modified by a single point mutation, (1998) *Biochemistry* 37, 2741-2747.
- 168 Imhof, D., Wavreille, A. S., May, A., Zacharias, M., Tridandapani, S., Pei, D., Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 Src homology 2 domains. Critical roles of residues beyond the pY+3 position, (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 20271-20282.
- 169 Lee, C. H., Kominos, D., Jacques, S., Margolis, B., Schlessinger, J., Shoelson, S. E., Kuriyan, J., Crystal structures of peptide complexes of the amino-terminal SH2 domain of the Syk tyrosine phosphatase, (1994) *Structure* 2, 423-438.
- 170 Arold, H., Reissmann S., Synthese von Analoga des Bradykinins mit threo- β -Phenylserin, (1970) *J. Prakt. Chem.* 312, 1130-1144.
- 171 Arold, H., Reissmann S., Synthese von Analoga des Bradykinins mit erythro- β -Phenylserin, (1970) *J. Prakt. Chem.* 312, 1145-1160.
- 172 Arold, H., Reissmann S., Synthese von Analoga des Bradykinins mit α -Amino- β -Phenylbuttersäure, (1970) *J. Prakt. Chem.* 316, 93-102.
- 173 Heyl, D. L., Schmitter, S. J., Bouzit, H., Johnson, T. W., Hepp, A. M., Kurtz, K. R., Mousigian, C., Substitution of aromatic and nonaromatic amino acids for the Phe3 residue in the delta-selective opioid peptide deltorphin I: effects on binding affinity and selectivity, (1994) *Int. J. Pept. Protein Res.* 44, 420-426.
- 174 Hruby, V. J., al-Obeidi, F., Kazmierski, W., Emerging approaches in the molecular design of receptor-selective peptide ligands: conformational, topographical and dynamic considerations, (1990) *Biochem. J.* 268, 249-262.

- 175 Schiller, P. W., Weltrowska, G., Nguyen, T. M., Lemieux, C., Chung, N. N., Marsden, B. J., Wilkes, B. C., Conformational restriction of the phenylalanine residue in a cyclic opioid peptide analogue: effects on receptor selectivity and stereospecificity, (1991) *J. Med. Chem.* 34, 3125-3132.
- 176 Imhof, D., Nothmann, D., Zoda, M.S., Hampel, K., Wegert, J., Böhmer, F.D., Reissmann S., Synthesis of linear and cyclic phosphopeptides as ligands for the N-terminal SH2-domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *J. Pept. Sci.* 11, 390-400.
- 177 Imhof, D., Wieligmann, K., Hampel, K., Nothmann, D., Zoda, M. S., Schmidt-Arras, D., Zacharias, M., Böhmer, F. D., Reissmann S., Design and biological evaluation of linear and cyclic phosphopeptide ligands of the N-terminal SH2 domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *J. Med. Chem.* 48, 1528-1539.
- 178 Park, J., Fu, H., Pei, D., Peptidyl aldehydes as reversible covalent inhibitors of Src homology 2 domains, (2003) *Biochemistry* 42, 5159-5167.
- 179 Besser, D., Müller, B., Kleinwächter, P., Greiner, G., Seyfarth, L., Steinmetzer, T., Arad, O., Reissmann, S., Synthesis and Characterization of Octapeptide Somatostatin Analogues with Backbone Cyclization: Comparison of Different Strategies, Biological Activities and Enzymatic Stabilities, (2000) *J. Prakt. Chem.* 342, 537-545.
- 180 Andrews, D. M., Kitchin, J., Seale, P. W., Solid-phase synthesis of a range of phosphorylated peptides by post-assembly phosphitylation and oxidation, (1991) *Int. J. Pept. Protein Res.*, 38, 469-475.
- 181 Müller, B., Besser, D., Kleinwachter, P., Arad, O., Reissmann, S., Synthesis of N-carboxyalkyl and N-aminoalkyl functionalized dipeptide building units for the assembly of backbone cyclic peptides, (1999) *J. Pept. Res.*, 54, 383-393.
- 182 Schumann, C., Seyfarth, L., Greiner, G., Reissmann, S., Synthesis of different types of dipeptide building units containing N- or C-terminal arginine for the assembly of back-bone cyclic peptides, (2000) *J. Pept. Res.*, 55, 428-435.
- 183 Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, (1970) *Nature* 227, 680-685.
- 184 van Veldhoven, P. P., Mannaerts, G. P., Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar rang, (1987) *Anal. Biochem.* 161, 45-48.
- 185 Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- 186 Ramalingam, K., Eaton, S. R., Cody, W. L., Loo, J. A., Doherty, A. M., Side reactions in the synthesis of phosphotyrosine-containing peptides, (1994) *Lett. Pept. Sci.* 1, 73-79.
- 187 Ottinger, E. A., Xu, Q., Barany, G., Intramolecular pyrophosphate formation during N alpha 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) solid-phase synthesis of peptides containing adjacent phosphotyrosine residues, *Pept. Res.* 9, 223-228.
- 188 Kitas, E. A., Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., Alternative Strategies for the Fmoc Solid-Phase Synthesis of O4-Phospho-L-tyrosine-Containing Peptides, (1991) *Helv. Chim. Acta.* 74, 1314-1328.
- 189 White, P., Optimization of coupling methods for the introduction of mono-benzyl phosphate esters of Fmoc protected phosphoamino acids, (2001) *Peptides-The wave of the future*, 97-98.
- 190 Pascal, R., Schmit P..O., Mendre, Ch., Dufour M. N., Guillon, G., Use of Diisopropylcarbodiimide in the solid-phase synthesis of phosphorylated peptides by the pre-formed phosphoamino acid building block approach, (2001) *Peptides 2000 - Proceedings of the twenty-sixth European peptide symposium*, 263-264.
- 191 Li, P., Peach, M. L., Zhang, M., Liu, H., Yang, D., Nicklaus, M., Roller, P. P., Structure-based design of thioether-bridged cyclic phosphopeptides binding to Grb2-SH2 domain, (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 895-899.
- 192 Hampel, K., Regulation der Enzymaktivität der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 durch monophosphorylierte SH2-Domänen-Liganden, (2006) Dissertation, 50-51.
- 193 Nice, E. C., Catimel, B., Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions, (1999) *BioEssays* 21, 339-352.
- 194 Barchi, J. J., Nomizu, M., Otaka, A., Roller, P. P., Burke, T. R., Conformational analysis of cyclic hexapeptides designed as constrained ligands for the SH2 domain of the p85 sub-unit of phosphatidylinositol-3-OH kinase, (1996) *Biopolymers*, 38, 191-208.
- 195 Burke, T. R., Nomizu, M., Otaka, A., Smyth, M. S., Roller, P. P., Case, R. D., Wolf, G., Shoelson, S. E., Cyclic peptide inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase p85 SH2 domain binding, (1994) *BBRC*, 201, 1148-1153.
- 196 Qvit, N., Hatzubai, A., Shalev, D. E., Friedler, A., Ben-Neriah, Y., Gilon, C., Design and synthesis of backbone cyclic phosphopeptides: the IkappaB model, (2009) *Biopolymers*, 91, 157-168.

- 197 Nomizu, M., Otaka, A., Burke, T. R., Roller, P. P., Synthesis of phosphonomethylphenylalanine and phosphotyrosine containing cyclic peptides as inhibitors of protein tyrosine kinase/SH2 interactions, (1994) *Tetrahedron*, 50, 2691-2702.
- 198 Perich, J. W., Nguyen, D. L.; Reynolds, E. C., The facile synthesis of ala-glu-tyr(P)-ser-ala by 'Global' di-*t*-butylN,N'-Phosphite-triester' phosphorylation of a resin-bound peptide, (1991) *Tetrahed. Lett.*, 32, 4033-4034.
- 199 Perich, J. W., Efficient solid phase synthesis of mixed Thr(P)-, Ser(P)- and Tyr(P)-containing phosphopeptides by "global" "phosphate-triester" phosphorylation, (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.*, 40, 134-140.
- 200 Perich, J. W., Meggio, F., Pinna, L. A., Solid phase synthesis of pp60src-related phosphopeptides via 'global' phosphorylation and their use as substrates for enzymatic phosphorylation by casein kinase-2, (1996) *Bioorg. Med. Chem.*, 4, 143-150.
- 201 Perich, J. W., Ruzzene, M., Pinna, L. A., Reynolds, E. C., Efficient Fmoc/solid-phase peptide synthesis of O-phosphotyrosyl-containing peptides and their use as phosphatase substrates, (1994) *Int. J. Pept. Protein Res.*, 43, 39-46.
- 202 Hoffmann, R., Wachs, W. O., Berger, R. G., Kalbitzer, H. R., Waidelich, D., Bayer, E., Wagnerreder, W., Zeppezauer, M., Chemical phosphorylation of the peptides GGXA (X = S, T, Y): an evaluation of different chemical approaches, (1995) *Int. J. Pept. Protein Res.*, 45, 26-34.
- 203 McMurray, J. S., Coleman, D. R., Wang, W., Campbell, M. L., The synthesis of phosphopeptides. (2001) *Biopolymers*, 60, 3-31
- 204 Perich, J. W., Johns, R. B., An Improved One-pot Synthesis of N α -(*tert*-Butoxycarbonyl)-O-(O',O''-dialkylphosphoro)-L-tyrosines Using Dialkyl N,N-Diethylphosphoramidites, (1989) *Synthesis-Stuttgart*, 701-703.
- 205 Mathe, C., Perigaud, C., Gosselin, G., Imbach, J. L., Phosphopeptide Prodrug Bearing an S-Acyl-2-thioethyl Enzyme-Labile Phosphate Protection, (1998) *J. Org. Chem.*, 63, 8547-8550. *J. Org. Chem.*, 63, 8547-8550.
- 206 Guex, N., Peitsch, M. C., SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling, (1997) *Electrophoresis*, 18, 2714-2723.
- 207 Case, D. A., Pearlman, D. A., Caldwell, J. W., Cheatham, T. E., III, Ross, W. S., Simmerling, C. L., Darden, T. A., Merz, K. M., Stanton, R. V., Cheng, A. L., Vincent, J. J., Crowley, M., Tsui, V., Radmer, R. J., Duan, Y., Pitera, J., Massova, I., Seibel, G. L., Singh, U. C., Weiner, P. K., Kollman, P. A. (2003) *Amber 8*, University of California, San Francisco, CA.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir diese Arbeit ermöglichten und mich dabei unterstützten.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt dabei **Dr. Diana Imhof** für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeiten. Ihre richtungsweisenden Denkanstöße und Sichtweisen auf aufgeworfene Fragen sowie die Bereitschaft, jederzeit Fragen und Probleme mit mir zu diskutieren, waren mir eine große Hilfe bei der Bearbeitung der gesamten Thematik.

Ich danke **Prof. Dr. Th. Heinzel** für die sehr guten Arbeitsbedingungen und für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Biochemie und Biophysik der FSU Jena anzufertigen.

Für die Durchführung der Dockingexperimente bedanke ich mich ganz herzlich bei **Prof. Dr. M. Zacharias** (Theoretische Biophysik-Molekulardynamik, TU München).

Weiterer Dank gilt **Prof. Dr. F. Große** (AG Biochemie, FLI Jena) für die Bereitstellung des Biacore 2000.

Desweiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei **Dr. K. Hampel** (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel) für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Biacore-Thematik und die hilfreichen Telefonate.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Biophysik, vor allem aber meinen Kollegen der „AG Peptidchemie“, **Toni Kühl**, **Alesia Miloslavina** und **Inge Agricola** für die hilfreiche Unterstützung sowie dem angenehmen Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt dabei **Melanie Nikolajski** für den moralischen Beistand bei den nächtlichen Biacore-Messungen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Freund **Silvio Dutz**, **meiner Familie** und **meinen Freunden** für die geduldige Unterstützung und die aufbauenden Worte, die für das Gelingen der Arbeit sehr wichtig waren.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität Jena bekannt ist.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen sind und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben sind.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Anfertigung des Manuskriptes haben mir keine Personen geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere die Hilfe eines Vermittlungs- bzw. Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Auch Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten von mir erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ferner erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena, den

Kathleen Teichmann